

**Der Einfluss der Protease Elastase
auf das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten
uropathogener *Escherichia coli***

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Werner v. Wulffen
geboren am 4. Januar 1975 in Hannover**

Gutachter:

1. Prof. Dr. Straube, Jena
2. Prof. Dr. Misselwitz, Jena
3. Prof. Dr. Lehn, Regensburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 12. Juli 2004

Inhalt

Inhalt	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
0 Zusammenfassung	1
1 Einführung	3
1.1 <i>Escherichia coli</i>	5
1.2 Bakterielle Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren	6
1.2.1 Geißeln (H-Antigene)	6
1.2.2 Kapselantigene (K-Antigene)	7
1.2.3 Lipopolysaccharid (LPS) und O-Antigene	7
1.2.4 Fimbrien (F-Antigene, Pili, Fibrillen).....	8
1.2.5 Afimbriale Adhäsine (afa's) und Familie der Dr-Adhäsine.....	11
1.2.6 Hämolysine	12
1.2.7 weitere Virulenzfaktoren	13
1.2.8 Organisation der Virulenzfaktoren in Pathogenitätsinseln	14
1.2.9 Mögliche Beeinflussbarkeit der Virulenzfaktoren durch Proteasen	15
1.3 Harnwegsinfektionen	
1.3.1 Definition, Epidemiologie und klinische Einteilung	15
1.3.2 Prädisponierende und infektionsbegünstigende Faktoren	17
1.3.4 Abwehrmechanismen des Wirts	18
1.4 Infektionsmechanismus	
1.4.1 Adhärenz	19
1.4.2 Internalisierung	19
1.4.3 Mögliche Angriffspunkte von Proteasen im Infektionsmechanismus ..	20
1.4.4 Bedeutung von Wachstumsfaktoren für die Adhärenz und Internalisierung	21
1.5 Elastase	
1.5.1 Vorkommen und biochemische Eigenschaften	21
1.5.2 Bedeutung der Elastase für Entzündungsgeschehen und Immunabwehr	24
1.6 Fragestellung und Konzeption der Versuche	28

2 Material und Methoden

2.1	benutzte Materialien und Reagenzien	
2.1.1	Zellen	30
2.1.2	Bakterien und Kulturmedien	30
2.1.3	Materialien	31
2.1.4	Reagenzien und Puffer	31
2.1.5	Fluoreszenzfarbstoffe, Antikörper, Färbereagenzien	33
2.2	Zellkulturen	
2.2.1	Herstellung des Nährmediums	33
2.2.2	Stammhaltung	33
2.2.3	Zellkulturen in Mikrotiterplatten	33
2.3	Elastaseeinsatz	
2.3.1	Elastasestammlösungen	34
2.3.2	Behandlung der Bakterien mit Elastase	34
2.3.3	Behandlung der Zellen mit Elastase	35
2.3.4	Gemeinsame Inkubation von Bakterien und Zellen mit Elastase	35
2.4	Bestimmung von Adhärenz und Internalisierung	
2.4.1	Einstellen der Bakteriensuspension	35
2.4.2	Zugabe von EGF	36
2.4.3	Infektionsansätze	36
2.4.4	Bestimmung der Adhärenz	36
2.4.5	Bestimmung der Internalisierung	37
2.5	Internalisierung von beladenen Latexpartikeln	37
2.5.1	Beladen der Latexpartikel	37
2.5.2	Markierung mit FITC	38
2.5.3	Inkubation mit Zellen	38
2.6	Isolierung der elastasespezifischen Antikörper mittels Immunpräzipitation	
2.6.1	Verfahren	39
2.6.2	Kontrolle der isolierten Antikörper	40
2.7	Markierung der gebundenen Elastase an der Bakterienoberfläche (indirekte Immunfluoreszenz)	40
2.8	Dotblot	41
2.8.1	Aufbringen der Bakterien auf Nitrozelluloseplatten	41
2.8.2	Anfärben gebundener Antikörper mittels POD-Reaktion	42

2.9	Messung der proteolytischen Aktivität	
2.9.1	Messprinzip	43
2.9.2	Herstellung des Substrats	43
2.9.3	Messvorgang	43
2.9.4	Nullkontrolle	44
2.10	Auswertung und statistisches Vorgehen	
2.10.1	Adhärenz- und Internalisierungsversuche	44
2.10.2	Antikörpermarkierungen	46
2.10.3	Internalisierung von Latexpartikeln	46
2.10.4	proteolytische Aktivität	46
3	Ergebnisse	
3.1	Adhärenz und Internalisierung an T24-Zellen	
3.1.1	<i>Escherichia coli</i> mit Elastase behandelt	47
3.1.2	Elastasevorbehandlung der Zellen	53
3.1.3	Elastasezugabe zum Infektionsansatz	58
3.2	Kontrolle der isolierten Antikörper	63
3.3	indirekte Immunfluoreszenz	63
3.4	Dot blot	63
3.5	Internalisierung von Latexpartikeln	64
3.6	Messung der proteolytischen Aktivität gegenüber Azocasein	65
4	Diskussion	
4.1	Diskussion der Methode	69
4.2	Fehlerbetrachtung	72
4.3	Diskussion der Ergebnisse	
4.3.1	Beeinflussung von Adhärenz und Internalisierung durch Elastase	73
4.3.2	Einfluss von EGF auf die Internalisierung von behandelten und unbehandelten <i>E. coli</i>	75
4.3.3	Wird Elastase an die Bakterienoberfläche gebunden?	77
4.4	Mögliche Wirkmechanismen der Virulenzsteigerung	
4.4.1	Anatomische und physiologische Überlegungen	79
4.4.2	Hypothese 1: Veränderung der Expression von Virulenzfaktoren	80
4.4.3	Hypothese 2: Posttranslationelle Modifikation von Virulenzfaktoren ..	84
4.5	Ausblick und Skizzierung weiterer experimenteller Ansätze	85

5 Schlussfolgerungen	89
6 Literaturverzeichnis	91
7 Anhang	
7.1 Danksagung	103
7.2 Lebenslauf	104
7.3 Ehrenwörtliche Erklärung	105

Abkürzungsverzeichnis

A _{Ela}	Aktivität der Elastase [U/ml]	MWM	U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney
Afa	afimbriales Adhäsın	MRHA	Mannose-resistente Hämagglutination
AK	Antikörper	MSHA	Mannose-sensible Hämagglutination
Aqua dest.	Aqua destillata	N	normale Lösung
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	ng	Nanogramm
cfu	koloniebildende Einheiten (colony forming units)	nm	Nanometer
Da	Dalton (Einheit des Molekulargewichts)	n.s.	nicht signifikant
DMEM	Dulbecco's Mem (s. 2.1.4)	p	P-Wert des statistischen Tests
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PBS	Phosphate Buffered Saline
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)	PBS-Ma	PBS + 10% Magermilch
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure	PBS-MaTw	PBS + 0,01% Tween 20 + 1% Magermilch
EGF	Epidermal Growth Factor	PBS-Tw	PBS + 0,01% Tween 20
FITC	Flourescin-iso-thiocyanat	POD	Peroxydase
FKS	fetales Kälberserum	Q ₂₅	25-Quartil
g	Gramm	Q ₇₅	75-Quartil
h	Stunde(n)	rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
Hrsg.	Herausgeber	RSA	Rinder-Serumalbumin
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom	SD	Standardabweichung (standard deviation)
HWI	Harnwegsinfekt(e)	TCE	Trichloressigsäure
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor α
i.e.	id est (das ist)	U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
IgA /G /M	Immunglobulin A/G/M	UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
IL-6	Interleukin 6	VF	Virulenzfaktor
IL-8	Interleukin 8	ZNS	Zentralnervensystem
kDa	kilo-Dalton	ZT	Zimmertemperatur
l	Liter		
λ	Wellenlänge (lambda)		
E- α 1-PIK	Leukozyten-Elastase- α 1-Protease-Inhibitor-Komplex		
M	Mol / molar		
M199	Medium 199 (s. 2.1.4)		
Med	Median		
MIC	Minimale Hemmkonzentration (minimal inhibiting concentration)		
μ g	Mikrogramm		
μ l	Mikroliter		
mg	Milligramm		
min	Minute(n)		
ml	Milliliter		
mM	Millimol / millimolar		
MTP	Mikrotiterplatte		
MW	Mittelwert (arithmetisches Mittel)		

0 Zusammenfassung

Harnwegsinfektionen (HWI) gehören weltweit zu den häufigsten Infektionen. Der dominierende Erreger bei ambulant erworbenen HWI ist *Escherichia coli*, ein gramnegatives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae. Die Mechanismen, deren sich *E. coli* zur Infektion der Harnwege bedient, sind in der Vergangenheit bereits Gegenstand intensiver Forschung gewesen. Als wesentliches pathogenes Prinzip haben sich dabei die Adhäsion, d.h. Anheftung an das Urothel, und die Internalisierung, d.h. die Aufnahme in die Zellen, herausgestellt. Letzteres sind Vorgänge, die auf der Aktivierung von intrazellulären Signalübertragungswegen durch Rezeptoren der befallenen Wirtszellen beruhen und an das Vorhandensein von Oberflächenfaktoren und deren spezifischen Rezeptoren sowohl bei den Bakterien als auch auf den Epithelzellen des Wirts gebunden sind. Der Internalisierungsvorgang bietet den Bakterien die Möglichkeit, der Immunabwehr zu entkommen. Zunehmend wird auch die Bedeutung von Interaktionen des Immunsystems mit den Erregern erkannt.

Ein in diesem Zusammenhang bisher wenig beachteter Mechanismus der Infektabwehr ist die Herstellung und Ausschüttung von Proteasen (proteolytisch aktiven Enzymen), die eine große Bedeutung in der Abwehr vor allem gramnegativer Infektionen haben. Ein sehr weit verbreitetes Enzym ist die von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen synthetisierte Elastase. Neben der Bedeutung für die Lyse gramnegativer Bakterien lassen sich bei vielen akuten und chronischen Entzündungen im Körper erhöhte Elastaseaktivitäten zeigen, so unter anderem bei Harnwegsinfektionen, bei denen innerhalb der ersten Stunden die Elastasekonzentration im Urin und im Serum um ein Vielfaches ansteigt. Auch einige Bakterienspezies sind in der Lage, Enzyme mit elastolytischer Aktivität zu synthetisieren. Über die Wirkung von Elastase und/oder Elastasehemmstoffen auf den Verlauf von HWI ist bisher nur sehr wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, in einem einfachen Infektionsmodell die Wirkung von Elastase auf die Adhärenz und Internalisierung von uropathogenen *E. coli* gegenüber Urothelkarzinomzellen zu untersuchen.

Dafür wurden Zellkulturen mit Bakterien infiziert und anhand dieser Zellkulturen die Adhärenz- und Internalisierungsraten mit und ohne Elastase bestimmt. Dabei wurden in getrennten Experimenten die verschiedenen möglichen Angriffspunkte der Elastase untersucht. Im ersten Ansatz wurden die Zellen, im zweiten die Bakterien behan-

delt; in einem dritten Ansatz wurde Elastase dem Infektionsansatz zugegeben. Dabei zeigte sich, dass Elastase die Adhärenz um den Faktor 1,5-2,5 und die Internalisierung um den Faktor 1,5–3 steigern kann, wenn entweder die Bakterien vorbehandelt werden oder Elastase im Infektionsansatz vorhanden ist. Die Vorbehandlung der Zellen hingegen ergibt keinen signifikanten Effekt.

Zur Klärung dieser Steigerung wurde untersucht, ob die *E. coli* in der Lage sind, Elastase an ihrer Oberfläche zu binden und so ihre Virulenz zu steigern; ein entsprechender Mechanismus ist für Plasminogen beschrieben. Sowohl die indirekte Immunfluoreszenz als auch die Peroxidasereaktion zeigten keine Anwesenheit von Elastase an der Bakterienoberfläche, und auch die proteolytische Aktivität gegenüber Azocasein änderte sich nicht. Daher scheidet ein solcher Vorgang als Erklärung aus. Die Beladung von Latexpartikeln mit Elastase führt ebenfalls nicht zu einer erhöhten Internalisierung, sodass die Beobachtungen auch nicht mit der unspezifischen Induktion einer Endozytose durch Elastase zu erklären sind.

Es bleiben als Erklärungsansätze zwei Hypothesen. Erstens bildet die Konfrontation der Bakterien mit einem Enzym der Immunabwehr eine Herausforderung; auf andere Stresssituationen wie widrige Umweltbedingungen, zu besiedelnde Oberflächen und Antibiotika in niedrigen Konzentrationen reagieren *E. coli* mit einer verstärkten Expression von Virulenzfaktoren und einer der Situation angepassten Adaption des Expressionsmusters. Es wäre also denkbar, dass auch die Anwesenheit von Elastase zu einer verstärkten Expression von Adhäsinen oder anderen Faktoren führt. Zweitens ist bei anderen Bakterienspezies eine posttranslationale Modifizierung von Oberflächenantigenen durch Proteasen beschrieben worden. *E. coli* könnte die Elastase dazu nutzen, die eigenen Oberflächenantigene zu prozessieren und damit die Wirksamkeit zu verbessern.

Die vorliegende Arbeit beschreibt zum ersten Mal eine Steigerung der Adhärenz und Internalisierung von uropathogenen *E. coli* durch die Anwesenheit von Elastase. Den Wirkmechanismus kann sie allerdings nicht erklären. Eine Möglichkeit konnte experimentell ausgeschlossen werden. Daher sind weitergehende Untersuchungen notwendig, die vor allem o.g. Hypothesen im Blick haben können. Zumindest aber bieten die vorliegenden Ergebnisse eine weitere Facette im komplexen Zusammenspiel zwischen Wirt und Erreger bei Harnwegsinfektionen.

1 Einführung

Harnwegsinfektionen (HWI) gehören in den Ländern der westlichen Welt zu den häufigsten ambulant erworbenen Infektionen, die Patienten zum Arzt führen. Auch unter den im Krankenhaus erworbenen Infektionen nehmen sie eine wichtige Stelle ein und stellen so ein bedeutendes medizinisches Problem dar (Johnson 1991, Ölschläger et al. 2002). Der am häufigsten bei ambulant erworbenen HWI angetroffene Erreger ist *Escherichia coli*, der bei 60-80 % aller Infektionen isoliert werden kann. Bei nosokomialen HWI ist der Anteil mit 45-55 % geringer. Der Anteil von *E. coli* nimmt zwar in jüngerer Zeit zu Gunsten anderer Erreger ab, dennoch ist *E. coli* nach wie vor einer der Hauptverursacher von HWI (Kahlmeter 2000, Grude et al. 2001, Bonadio et al. 2001). In der Prophylaxe und Therapie von HWI haben sich in den vergangenen Jahren einige Probleme herausgestellt, die zunehmend die Behandlungsergebnisse beeinträchtigen: Zum einen wächst die Zahl von immunsupprimierten Patienten und damit auch die Anfälligkeit für Infektionen aller Art stetig, und die Zahl der Patienten, bei denen ein oder mehrere prädisponierende Faktoren für die Entwicklung eines HWI vorliegen, nimmt durch die ansteigende Prävalenz des Typ II-Diabetes ebenfalls zu (s. 1.4.2). Zum anderen ist ein immer größer werdender Anteil der Bakterien resistent gegen die gängigen Antibiotika; nicht selten werden inzwischen Stämme isoliert, die nur noch gegen zwei oder weniger verschiedene Antibiotikaklassen empfindlich sind und so die Kriterien der Multiresistenz erfüllen.

Entsprechend wurden in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen, die Mechanismen des HWI aufzuklären. Vieles ist bekannt geworden über die prädisponierenden Erkrankungen des Wirts (s. 1.3.2), die notwendigen und virulenzbestimmenden bakteriellen Faktoren (s. 1.2) und den Einfluss der Infektionsabwehr des Wirts auf die Entwicklung von HWI. Dennoch bleiben viele Vorgänge unklar. Lange bekannte Oberflächenantigene von *E. coli* erfahren eine grundlegende Neubewertung. Neue Gene werden entdeckt, deren Bedeutung noch nicht hinreichend definiert ist (Russo et al. 1996, 1999, 2001). Die Organisation von Virulenzgenen in Pathogenitätsinseln rückt zunehmend in den Blickpunkt der Forschung (Hacker und Kaper 2000, Ölschläger 2002). Unstrittig ist die entscheidende Bedeutung des Anheftens der Erreger an das Urothel als erster Schritt einer Besiedlung; dieser Schritt wird als Adhärenz bezeichnet, die dafür notwendigen Faktoren der Erreger als Adhäsine

(Johnson 1991). Ein weiterer Schritt in der Pathogenese ist die Aufnahme der Bakterien in die Zellen, die Internalisierung (s. 1.4).

Einen Teil des sehr differenzierten Abwehrsystems gegenüber bakteriellen Infektionen stellt die Bildung und Freisetzung von proteolytisch aktiven Enzymen durch Zellen des Immunsystems dar, insbesondere durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Neben einer Reihe anderer Proteasen ist ein wichtiger Vertreter ein elastolytisches Enzym, seiner Herkunft wegen (humane) Leukozyten-Elastase genannt. Deren Wichtigkeit in der Abwehr gramnegativer Infektionen wurde bereits demonstriert (Belaouaj et al. 1998 und 2000). Sie findet sich in erhöhter Konzentration bei vielen infektiösen oder sterilen Entzündungen im Körper, so z.B. bei HWI, Glomerulonephritiden, chronischen Bronchitiden, der Cystischen Fibrose und der Rheumatoiden Arthritis, und ist dort, insbesondere bei chronischen Prozessen, für die Gewebszerstörungen und Umbauprozesse mitverantwortlich (Starkey et al. 1977, Oda et al. 1997, Moore et al. 1999, Fretzayas et al. 2000, Taggart et al. 2000).

Die Anwesenheit von *E. coli* in den ableitenden Harnwegen führt zu einer sehr schnellen und effektiven Rekrutierung von Zellen des Immunsystems (Agace et al. 1995, Friendéus et al. 2001). Diese setzen unter anderem auch Elastase frei, die bei HWI in deutlich erhöhter Konzentration im Urin zu messen ist. Bei gesunden Kontrollpersonen hingegen ist die Elastasekonzentration im Urin gering (Fretzayas et al. 2000, Bakakos et al. 2002, s.a. 1.5.2). Bisher ist über die direkte Wechselwirkung zwischen *E. coli* und proteolytischen Enzymen bei HWI wenig bekannt; es existieren keine Erkenntnisse darüber, ob und wenn ja wie sich die Anwesenheit von Elastase auf die Interaktion zwischen *E. coli* und Wirtszellen auswirkt. Bei anderen Bakterienarten hat die proteolytische Aktivität einen großen Einfluss auf die pathogenen Eigenschaften, so z.B. bei Streptokokken, Pseudomonaden und Erregern von oralen Infektionen (s. Kap. 4.4). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, einen Aspekt der Proteasenwirkung näher zu untersuchen, und zwar die Wirkung von Elastase auf das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten uropathogener *E. coli* (UPEC) in einem experimentellen Infektionsmodell.

1.1 *Escherichia coli*

Bei den Bakterien der Spezies *Escherichia coli* handelt es sich um gramnegative, stäbchenförmige, nicht sporenbildende und fakultativ anaerobe Vertreter der Familie der Enterobacteriaceae (Hahn et al. 1999). *E. coli* ist für eine Vielzahl von Erkrankungen des Menschen verantwortlich. Es existieren eine große Anzahl von verschiedenen Serogruppen, und auch die genetische Ausstattung mit Virulenzfaktoren (s. 1.2) ist zwischen den einzelnen Stämmen sehr unterschiedlich. Je nach Vorhandensein bzw. Abwesenheit spezifischer Merkmale kommen *E. coli* entweder als Bestandteil der normalen Darmflora oder als pathogene Erreger vor. Anhand einiger Merkmale wie Exotoxinbildung u.a. können so eine Reihe obligat pathogener Erreger von Darmerkrankungen unterschieden werden, so enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAggEC), enterotoxinogene *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). Andere Stämme hingegen haben die Fähigkeit, eitrige Infektionen verschiedener Organe auszulösen, wenn sie durch Aszension (z.B. in den Gallengängen, in den ableitenden Harnwegen), Perforation mit direkter Verschleppung (z.B. Bauchhöhle) oder hämatogene Streuung (z.B. Lunge, Meningen, Gehirn) in andere Bereiche des Körpers vordringen (Hahn et al. 1999). Dabei existiert eine Korrelation von Serotypen und bevorzugt betroffenen Organen (Johnson 1991). Die Stämme, die als auslösender Keim bei HWI isoliert werden, werden in der Literatur zur Gruppe der uropathogenen *E. coli* (UPEC) zusammengefasst. Auf die häufig in dieser Gruppe angetroffenen Virulenzfaktoren wird unter 1.2 näher eingegangen.

HWI stellen die häufigste Manifestation einer *E. coli*-Infektion dar. Auch unter den Erregern einer gramnegativen Sepsis nimmt *E. coli* mit ca. 30 % Anteil die Spitze ein (Hahn et al. 1999). Bei Neugeborenen ist seit der Einführung des Mütter-Screenings auf Streptokokken der Lancefield-Gruppe B nun *E. coli* der häufigste Erreger einer Meningitis in den Ländern der westlichen Welt (Baltimore et al. 2001), ohne B-Streptokokken-Prophylaxe ist es mit ca. 16 % der zweithäufigste Erreger (Holt et al. 2001).

Entsprechend der oben getroffenen Einteilung befasst sich diese Dissertation mit den uropathogenen *E. coli* (UPEC); die obligat (darm)pathogenen *E. coli* sollen nicht betrachtet werden. Daher ist im Folgenden mit dem Terminus *E. coli* die Gruppe der

uropathogenen *E. coli* gemeint. Als repräsentative und häufig bei HWI angetroffene Serogruppe (Johnson 1991) wurden für die Versuche vier O18-Stämme verwendet, die in ihrer Pathogenität und ihrer Ausstattung mit Virulenzfaktoren genau charakterisiert und in ihrem Verhalten in Infektionsassays gut untersucht sind (Straube 1992, 1993, 2000).

Wegen der Vielzahl der unterschiedlichen Manifestationen einer *E. coli*-Infektion wurde für diese Dissertation als Modell die Harnwegsinfektion gewählt. Die untersuchten *E. coli*-Stämme sind uropathogen, die verwendeten T24-Zellen sind Zellen eines humanen Übergangszellkarzinoms. Die Ausführungen beziehen sich daher im Wesentlichen auf das Infektionsmodell der Harnwegsinfektion.

1.2 Bakterielle Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren

Mit Pathogenität wird die Fähigkeit eines Bakteriums oder eines Stammes bezeichnet, in einem befallenen Wirtsorganismus pathologische Veränderungen hervorrufen zu können. Die Ausprägung der krankheitserzeugenden Eigenschaften bestimmt die Virulenz des Erregers. Diese wiederum ergibt sich aus dem Vorhandensein verschiedener Moleküle und Faktoren, die zusammengefasst als Virulenzfaktoren bezeichnet werden: „Jedes Produkt, das von einem Bakterium hergestellt wird und das das Wachstum oder Überleben während der Interaktion mit dem Wirt verbessert, kann als Virulenzfaktor und die zugehörige genetische Sequenz als Virulenzgen aufgefaßt werden.“ (Neidhardt 1996).

Die Fähigkeit von *E. coli* zur Adhärenz und Internalisierung und damit zum entscheidenden Schritt in der Pathogenese (s. 1.5) beruht auf einer Reihe von Virulenzfaktoren, die im Folgenden kurz charakterisiert werden sollen. Dabei bleiben die Ausführungen auf UPEC beschränkt. Die Virulenzfaktoren, die die Anheftung an Wirtszellen oder andere Medien wie Agarplatten oder Polymeroberflächen ermöglichen, werden als Adhäsine bezeichnet (Patrick und Larkin 1995).

1.2.1 Geißeln (H-Antigene)

Geißeln sind fadenförmige, bewegliche Gebilde aus mehreren spiralförmigen Fibrillen, die aus Flagellin, einem kontraktilen Protein, bestehen. Im Bakterium sind sie mit einem Basalkörper verankert. *E. coli* verfügt über eine peritriche Begeißelung und ist damit beweglich. Die in den Geißeln befindlichen Antigene werden bei gramnegativen Stäbchen als H-Antigene bezeichnet (Hahn et al. 1999).

1.2.2 Kapselantigene (K-Antigene)

Bei der Bakterienkapsel, die auch von einigen *E. coli*-Stämmen gebildet wird, handelt es sich um repetitive, saure Polysaccharide, die eine hochvisköse und zur Oberfläche hin negativ geladene Struktur um die Bakterien herum bilden. Zu Beginn der Infektionsabwehr, in der Phase der unspezifischen Reaktion, bietet die Kapsel einen wirkungsvollen Schutz vor Phagozytose. Im Verlauf der Immunreaktion bilden sich dann aber gegen fast alle Kapselstrukturen hochspezifische Antikörper, die eine Opsonierung und nachfolgende Phagozytose durch die Abwehrzellen des Wirts erlauben. Ausnahmen sind einige K-Antigene, die Homologien zu Proteinen des Wirtsorganismus besitzen (Johnson 1991). Darüber hinaus behindern K-Antigene die Adhärenz der Bakterien an Zellen des Wirts (Straube et al. 1993).

1.2.3 Lipopolysaccharid (LPS) und O-Antigene

Die äußere Membran der gramnegativen Bakterien ist asymmetrisch aufgebaut: In der inneren Lage finden sich hauptsächlich Phospholipide, in der äußeren Lage sind neben diesen auch Lipopolysaccharide (LPS) eingelagert. Diese bilden einen charakteristischen Bestandteil der gramnegativen Bakterien und sind für einige der pathogenetischen Eigenschaften verantwortlich.

Das LPS besteht aus drei Teilen: O-Antigen, Kernpolysaccharid und Lipid A.

Der äußere Teil wird von den O-Antigenen gebildet. Meistens bestehend aus 3-20 Hexosemolekülen sind sie für die Hydrophilie der Bakterien verantwortlich: O-Antigen-tragende Bakterien bilden in Kultur glatte Kolonien (S-Formen), O-Antigen-negative bilden rauhe Kolonien (R-Formen).

Das Kernpolysaccharid besteht aus Galaktose, N-Acetyl-Glucosamin und Keto-desoxy-oktonat (KDO), einem LPS-spezifischen Zucker. Es findet sich bei den gramnegativen Bakterien ein weitgehend gleichartiger Aufbau, das Vorhandensein ist für das Bakterium essentiell (Hahn et al. 1999).

Das Lipid A als dritter Anteil des LPS dient als Membrananker. Darüber hinaus ist es für die meisten pathophysiologischen Eigenschaften des LPS, insbesondere bei systemischen Infektionen, wie Fieber, Blutdruckabfall, Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Makrophagen und Endothelzellen und septischer Schock verantwortlich.

Die Einteilung in verschiedene Serotypen erfolgt nach den unterschiedlichen Eigenschaften der drei Antigene O, K und H. Jeder *E. coli*-Stamm kann so einem O:K:H-Serotyp zugeordnet werden (Johnson 1991, Hahn et al. 1999).

1.2.4 Fimbrien (F-Antigene, Pili, Fibrillen)

Fimbrien sind haarförmige Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 2-8 nm, die in großer Zahl (100-1000 pro Zelle) auf Bakterien vorkommen. Sie sind aus einzelnen Proteinuntereinheiten mit einem Molekulargewicht von 14-30 kDa zusammengesetzt. Die meisten Fimbrien sind im Aufbau zweigeteilt: Einem recht starren Schaft sind Spitzen aufgesetzt, die in den meisten Fällen für die Adhäsionseigenschaften verantwortlich sind. An der Motilität der Bakterien sind sie hingegen nicht beteiligt (Neidhardt 1996). Genetische Untersuchungen zeigen, dass die Schaftbereiche bei vielen Bakterienarten eine hoch konservierte Region darstellen, während die eigentliche Antigenvariabilität vor allem bei den Bereichen und Untereinheiten an der Spitze zu finden ist (Finlay und Cossart 1997).

Die Fimbrien sind in Gestalt und Funktion sehr unterschiedlich. Die Klassifikation stützt sich auf drei verschiedene Einteilungen:

- Die Fähigkeit zur Hämagglutination und deren Hemmbarkeit durch Mannose. Typ1-Fimbrien (F1A) sind hemmbar (Mannose-sensitive Fimbrien = MS-Adhäsine), die meisten anderen Fimbrien agglutinieren Erythrozyten auch in Gegenwart von Mannose (Mannose-resistente Fimbrien = MR-Adhäsine).
- Ørskov und Ørskov teilten mit einem serologischen Ansatz die Fimbrien nach ihren Antigen-Eigenschaften in verschiedene F-Typen ein (Ørskov und Ørskov 1990).
- In jüngerer Zeit ist eine Einteilung nach Primärstruktur, kodierendem Genort und Genregulation getroffen worden (Neidhardt 1996).

Die Expression von Fimbrien ist stark von den Umgebungsbedingungen abhängig. So steigt die Expression bei schlechten Umweltbedingungen wie wenig Glucose und Aminosäuren im Kulturmedium an. Auch die Kohlenstoffzufuhr, die Konzentrationen von Eisen, aliphatischen Aminosäuren, verschiedenen Ionen und Elektronen-Akzeptoren außer O₂ beeinflussen die Anzahl und Qualität der gebildeten Fimbrien. Bei Temperaturen unter 26-28°C kommt die Synthese fast vollständig zum Erliegen (Neidhardt 1996). Trimethoprim hemmt bereits unterhalb der Minimalen Hemmkon-

zentration die Ausbildung der P-Fimbrien (Johnson 1991). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten Fimbrientypen gegeben werden.

- **Typ1-Fimbrien (F1A)**

Diese Fimbrien kommen auf sehr vielen Enterobakterien vor, so auch auf *E. coli*. Bei mehr als 90 % der Stämme, die bei Harnwegsinfektionen isoliert werden, können Typ1-Fimbrien nachgewiesen werden (Pak et al. 2001). Der helikale Schaft besteht aus vielen polymerisierten Kopien der Untereinheit FimA; an der Spitze sitzen zwei Adapterproteine, FimF und FimG, und das für die Adhäsions- und Internalisierungseigenschaften verantwortliche FimH. Als Rezeptorstruktur dienen Mannosidreste an diversen Glykoproteinen, die u.a. auf menschlichen und vielen tierischen Erythrozyten und einer Reihe von Epithelzellen an verschiedenen Orten im Organismus vorkommen (Johnson 1991, Martinez et al. 2000). Als weiterer Rezeptor wurden die unten näher beschriebenen Uroplakine identifiziert. Auch Zellen des Immunsystems, vor allem polymorphkernige Neutrophile, besitzen diese Rezeptoren, sodass neben der Opsonierung durch Antikörper auch die Bindung über Typ1-Fimbrien im Rahmen der Immunantwort eine Rolle spielt (Johnson 1991).

Die Rolle der Typ 1-Fimbrien wurde lange kontrovers diskutiert (Johnson 1991). Connell et al. konnten in jüngerer Zeit zeigen, dass Typ 1-Fimbrien für die Pathogenität von *E. coli* bei Harnwegsinfekten wichtig sind: Bei Typ1-Fimbrien-exprimierenden Stämmen der selben Serogruppe (O1:K1:H7) mit ansonsten identischen Virulenzfaktoren war sowohl der Krankheitsverlauf bei Harnwegsinfekten schneller und schwerer als auch der Verlauf im Tierexperiment von stärkeren Entzündungsreaktionen begleitet als bei Typ1-Fimbrien-negativen Stämmen (Connell et al. 1996).

Neben der bekannten Eigenschaft als Adhäsine (Johnson 1991) sind in den letzten Jahren einige weitere Funktionen erkannt worden. So lösen Typ1-Fimbrien eine Internalisierung in die Urothelzellen aus; entscheidender Faktor ist dabei die FimH-Untereinheit (Martinez et al. 2000). Die Rezeptoren auf den Zellen zur Induktion der Internalisierung sind die Uroplakine Ia und Ib (Pak et al. 2001, Ölschläger et al. 2002). Schembri und Klemm demonstrierten, dass einige Formen von FimH die Bakterien auch zu einer Ausbildung von Biofilmen auf künstlichen Oberflächen wie z.B. Kathetern befähigen (Schembri und Klemm 2001).

- **P-Fimbrien (F7₁-F16 = pap-Antigene)**

Die P-Fimbrien werden vor allem von *E. coli*-Stämmen gebildet, die HWI hervorrufen (pap = pyelonephritis-associated pili). Sie bestehen wie die anderen Fimbrien aus einer helikal angeordneten Kette von ca. 1000 PapA-Proteinen, den Untereinheiten des Fimbrienschafts. An der Spitze befinden sich in sehr viel kleinerer Menge die für die Adhäsionseigenschaften nötigen Untereinheiten PapE, F und G. PapG ist dabei für die Gal-Gal-Spezifität der Bindung verantwortlich (s.u.), PapE und F verankern PapG am Fimbrienschaft (Johnson 1991).

Der spezifische Bindungsort ist eine charakteristische terminale oder interne Kohlenhydratstruktur, die Gal(α 1-4)-Gal β -Sequenz in einer Reihe von Glykolipiden. Die Bindung an diese Gal-Gal-Sequenz ist nicht durch Mannose, aber durch die Zugabe von Glykopeptiden mit Gal-Gal-Gruppe hemmbar. Rezeptorstrukturen mit Gal-Gal-Sequenz kommen u.a. in den P-Antigenen der Erythrozyten (daher auch der Name P-Fimbrien) sowie auf uroepithelialen Zellen von P-Antigen-Trägern und einer Reihe weiterer Zellen, z.B. in Strukturen der Niere, vor. Ein Geschlechtsunterschied existiert dabei nicht. Für die Adhäsion an humane Leukozyten spielt dieser Rezeptor keine Rolle. Ungefähr ein Drittel der mit P-Fimbrien versehenen *E. coli*-Stämme binden auch an das Forssman-Antigen; die entsprechenden Fimbrien werden als Prs- oder Pap-2-Fimbrien bezeichnet (Johnson 1991).

Eine Metaanalyse verschiedener epidemiologischer Studien zeigt, dass bei ca. 70 % der Patienten, die eine durch *E. coli* hervorgerufene Pyelonephritis oder eine Urosepsis erleiden, P-Fimbrien-exprimierende Stämme gefunden werden. Dieser Anteil nimmt bei leichteren Formen eines Harnwegsinfekts wie bei der unkomplizierten Zystitis (36 %) und der asymptomatischen Bakteriurie (19 %) ab. Ebenso ist bei Harnwegsinfekten bei immunsupprimierten Patienten ein geringerer Anteil feststellbar. Dies lässt die Vermutung zu, dass bei ansonsten gesunden Patienten die P-Fimbrien ein besseres Überwinden eines – bisher noch nicht definierten – Abwehrmechanismus gestatten. Darüber hinaus führen P-Fimbrien-exprimierende Stämme zu einer stärkeren Entzündungsreaktion im Falle einer Infektion (Johnson 1991).

Bedeutung hat in jüngerer Zeit die Unterscheidung der verschiedenen Allele des papG-Gens erlangt: Von den drei Allelen papG I-III hat papG II eine deutlich erhöhte Prävalenz bei akuten oberen HWI; diese Häufigkeit nimmt beim Vorliegen von Anomalitäten des Urogenitaltrakts ab (Tseng et al. 2001). Die selben Autoren bestätigten

in einer retrospektiven Untersuchung, dass das Vorhandensein des papG Klasse II-Allel statistisch unabhängig und signifikant mit der Entstehung eines oberen HWI assoziiert ist (Tseng et al. 2002). Außerdem führen diese Stämme häufiger zu Rezidiven (Johnson et al. 2001).

- **S- und F1C-Fimbrien**

Diese beiden Fimbrientypen gehören zur S-Fimbrien-Superfamilie (Khan et al. 2000). S-Fimbrien vermitteln eine Mannose-resistente Hämagglutination (MRHA) bei *E. coli*-Stämmen, die keine P-Fimbrien exprimieren. Die Rezeptorstrukturen sind terminale Sialyl-Galaktosid-Reste und kommen im menschlichen Körper auf den Epithelien von Glomeruli und sämtlichen Abschnitten des Tubulus, im Bindegewebe der Niere und auf den Endothelien von vielen Gefäßen, nicht nur im Urogenitaltrakt, vor. Es besteht eine Assoziation zwischen der Expression der S-Fimbrien und einzelnen Serotypen (Johnson 1991).

S-Fimbrien-exprimierende Stämme können Harnwegsinfekte verursachen, sie sind aber häufiger als Erreger bei Meningitiden und bakteriämischen und septischen Zuständen zu finden (Johnson 1991). Ihre Rolle als Erreger von ZNS-Infektionen wird durch die Entdeckung plausibel, dass sie auch an Glykolipide im Gehirn adhärieren können (Prasadarao et al. 1993).

F1C-Fimbrien verursachen keine Hämagglutination. Die Rezeptorstruktur wurde kürzlich beschrieben und ist die Disaccharidsequenz GalNAc β (1-4)Gal β in Gangliosyl-Ceramid (Khan et al. 2000). Über diese wird eine Bindung von Bakterien an Zellen im proximalen Tubulus, von Blutgefäßen und der Muskulatur der Harnblase ermöglicht (Virkola et al. 1988). Dieser Fimbrientyp findet sich bei ca. 14 % aller *E. coli*-Isolate bei Harnwegsinfekten (Pere et al. 1985).

1.2.5 Afimbriale Adhäsine (afa's) und Familie der Dr-Adhäsine

In diese Gruppe werden alle Strukturen mit adhäsiven Eigenschaften eingeteilt, die nicht an Fimbrien gebunden sind. Sie vermitteln unter anderem die Bindung an die extrazelluläre Matrix bei Infektionen im Gewebe und bei Verletzungen (Finlay und Cossart 1997). Bei *E. coli* sind vor allem AfaD und AfaE von Bedeutung. Jouve et al. demonstrierten, dass die Interaktion zwischen *E. coli*, die entsprechende afa-Gencluster tragen, und HeLa-Zellen von AfaD- und AfaE-Proteinen vermittelt wird (Jouve et al. 1997). Die epidemiologische Bedeutung ist noch nicht restlos geklärt;

Johnson et al. zeigten z.B., dass AfaE-tragende Stämme selten zu rezidivierenden Infektionen führen und kaum bei mehrfachen Rezidiven angetroffen werden (Johnson et al. 2001). Die verwendeten O18-Stämme, obwohl klinische Isolate bzw. deren isogene Mutanten, verfügen sehr wahrscheinlich auch nicht über afa's (A. Käßner, persönliche Mitteilung).

Nowicki et al. schlugen in jüngerer Zeit vor, die afa's mit anderen, bisher Dr-Adhäsinen genannten adhäsiven Faktoren zur Familie der Dr-Adhäsine zusammenzufassen. Allen Mitgliedern dieser heterogenen Gruppe von Antigenen ist gemeinsam, dass sie eine sehr ähnliche genetische Organisation ihrer entsprechenden Gencluster aufweisen, häufig die Bakterien zur Invasion in epitheliale Zellen befähigen und als Rezeptor den Decay-accelerating Factor (DAF = CD55), ein Regulationsmolekül des Komplements, besitzen (Nowicki et al. 2001). *E. coli* mit diesen Virulenzfaktoren werden sowohl bei (häufig persistierenden) Durchfallerkrankungen bei Kindern als auch bei HWI isoliert. Bemerkenswerterweise scheinen diese Stämme vor allem bei Kindern und Schwangeren zu Zystitiden zu führen, während sie selten bei anderen Erwachsenen angetroffen werden und noch seltener Pyelonephritiden hervorrufen. Die Familie der Dr-Adhäsine scheint nach Typ1- und P-Fimbrien der dritthäufigste Kolonialisierungs- und Virulenzfaktor bei pathogenen *E. coli* zu sein (Nowicki et al. 2001).

1.2.6 Hämolysine

Hämolysine sind Produkte von *E. coli*, die Erythrozyten von vielen Säugetieren lysieren können. Neben dem unten beschriebenen α -Hämolysin existieren einige weitere, so z.B. β -Hämolysin, ein nicht sezerniertes Protein, und ein Enterohämolysin genanntes sezerniertes Toxin, das vorwiegend bei enteropathogenen *E. coli* (EPEC) vorkommt (Beutin 1991).

α -Hämolysin (Molekulargewicht 107-110 kDa) ist ein sekretorisches Produkt von *E. coli*-Stämmen, die vor allem bei extraintestinalen Infektionen wie Harnwegsinfekten und Sepsis als verursachender Keim gefunden werden (Beutin 1991). Es ist auch in bakterienfreien Überständen von *E. coli*-Kulturen aktiv, in seiner Aktivität stark von dem Ionenmilieu, der Temperatur, dem pH-Wert und der Zusammensetzung des Kulturmediums abhängig und kann durch spezifische Antikörper inaktiviert werden. Seine hämolytische Wirkung entfaltet es durch einen nicht-rezeptor-abhängigen Angriff auf die Membran von Erythrozyten, Zellen des Immunsystems und anderen Körper-

zellen (Bhakdi et al. 1989 und 1990). Dabei wird der Angriff vom Membranpotential der Zellen beeinflusst; der Einfluss von Ca^{2+} -Ionen wird in der Literatur widersprüchlich beurteilt. Es kommt zur Ausbildung einer hydrophilen Pore von 1,5-3 nm Durchmesser, die einen spannungsabhängigen Kanal bildet und durch den Wasser und Ionen in die Zellen einströmen können und zur Lyse führen (Bhakdi et al. 1986, Meneztrina et al. 1987).

Die Produktion von α -Hämolysin wird durch die Anwesenheit von freiem Eisen (FeCl_3) im Kulturmedium gehemmt, durch Zugabe von Eisenchelatoren gesteigert (Beutin 1991).

1.2.7 Weitere Virulenzfaktoren

Neben den Hämolysinen produzieren einige *E. coli*-Stämme noch weitere sezernierte Proteine, die als Virulenzfaktoren dienen. Das kleine Molekül Aerobactin (616 Da) löst Eisen heraus, das in Chelatoren des Wirts gespeichert ist, und dient so der Versorgung der Bakterien mit dem für sie essentiellen Eisen (Johnson 1991). Neben dem Aerobactin existieren weitere Proteine, die als Eisenfänger in Umgebungen mit Eisenmangel, z.B. im Urin, verstärkt exprimiert werden und zur Virulenz beitragen, so z.B. *IroN_{E. coli}* und *IreA* (Russo et al. 1999, 2001). Auch andere Nährstoffe wie Aminosäuren und Purinbasen, die die Bakterien nicht selbst produzieren können, müssen aus der Umgebung aufgenommen werden. Als entsprechende Rezeptorproteine wurden u.a. *ArgC* und *ArtJ* für Arginin und *GuaA* für Guanin gefunden bzw. für die entsprechenden Gene eine Hochregulation bei Wachstum von *E. coli* im Urin gezeigt (Russo et al. 1996, 1999).

Der zytotoxische nekrotisierende Faktor Typ 1 (cytotoxic necrotizing factor Type 1, CNF1), der von einer Reihe uropathogener *E. coli* gebildet wird, kann in vitro die Apoptose von Urothelzellen auslösen, weitere zelluläre Veränderungen verursachen und die Funktion von Immunzellen beeinflussen. Die Rolle in vivo wird aber noch kontrovers bewertet (Ölschläger et al. 2002). Die für diese Dissertation verwendeten O18-Stämme exprimieren diesen Virulenzfaktor nicht (Straube et al. 2000).

Das Typ III-Sekretionssystem, das bei vielen gramnegativen Bakterien, u.a. auch bei enteropathogenen *E. coli* bekannt ist, überträgt Effektorproteine des Bakteriums in die Wirtszelle (Galán und Collmer 1999). Neue Untersuchungen zeigen, dass zumindest einige UPEC-Stämme ebenfalls über dieses System verfügen (Miyazaki et al.

2002a). Da *E. coli* O18 aber kein Intimin exprimieren (Ölschläger T, persönliche Mitteilung), das ein wesentlicher Bestandteil des Typ III-Sekretionssystems ist, muss dieser Mechanismus bei den für die Versuche verwendeten UPEC mit Zurückhaltung diskutiert werden.

Die oben genannten und in der Literatur umfassend beschriebenen Virulenzfaktoren sind aber sehr wahrscheinlich nicht alle: Miyazaki et al. beschrieben UPEC-Stämme, die weder Typ1-, P- und S-Fimbrien noch afa I exprimierten und dennoch an Urothelzellen adhären und in sie internalisiert werden konnten (Miyazaki et al. 2002b). In der Literatur werden noch eine Reihe weiterer Faktoren beschrieben und diskutiert; die epidemiologische Bedeutung ist aber in den meisten Fällen unklar, da bisher nur wenige Untersuchungen an größeren Fallzahlen existieren (Johnson et al. 2001). Bei der gegebenen Heterogenität der UPEC-Stämme und der Patienten können einzelne Befunde schlecht auf die Allgemeinheit übertragen werden, zumal durchaus auch regionale Unterschiede zwischen den untersuchten Patientengruppen und den isolierten Stämmen bestehen.

1.2.8 Organisation der Virulenzfaktoren in Pathogenitätsinseln

Im Genom der meisten Bakterien finden sich hoch konservierte Regionen, die vor allem für Proteine des Grundstoffwechsels, der Zellwand und anderer lebenswichtiger Bestandteile des Bakteriums kodieren. Von diesen „Kern-Sequenzen“ (engl. core sequences) genannten Bereichen lassen sich andere Teile des Genoms anhand einiger typischer Merkmale unterscheiden: man findet relativ instabile Sequenzen mit deutlich abweichendem Gehalt an Guanin und Cytosin, anderen Codons und häufig flankierenden repetitiven Sequenzen (*directly repeated sequences*). Oft sind diese Bereiche mit Sequenzen für transfer-RNA (tRNA) assoziiert (Hacker und Kaper 2000, Ölschläger et al. 2002). Die enthaltenen Gene kodieren vor allem für Proteine, die zu einer Pathogenität und Virulenzsteigerung des betreffenden Stammes führen. Außerdem enthalten sie Mobilitätsgene wie z.B. Integrasen, die einen horizontalen Gentransfer erlauben. Ihrer inselartigen Lage im Bakteriengenom wegen werden diese Bereiche als Pathogenitätsinseln (PAIs) bezeichnet. Sie finden sich nur bei pathogenen Stämmen einer Spezies, während apathogene Stämme der selben Spezies keine PAIs beherbergen. Ihre Größe bewegt sich zwischen 10 und 200 Kilobasen, ihre hauptsächliche Lokalisation ist das Bakterienchromosom, wohin sie mittels horizontalen Gentransfer gelangen; wahrscheinlich liegen PAIs aber auch in Plasmiden und

Phagen vor. Bei virulenten *E. coli* K12-Stämmen machen PAIs ca. 17% des gesamten Genoms aus (Hacker und Kaper 2000).

Bei UPEC sind vor allem die Kodierung von Adhäsinen, Toxinen und Proteinen des Stoffwechsels unter Mangelbedingungen, so z.B. Eisenaufnahme-Systeme, auf PAIs beschrieben worden. So sind bei vielen UPEC die Gene für P-Fimbrien (*pap*) und Exotoxine wie α -Hämolysin und CNF1 auf einer PAI zu finden. Eine andere PAI kodiert häufig für S-Fimbrien und Eisenaufnahme-Systeme (Hacker und Kaper 2000).

1.2.9 Mögliche Beeinflussbarkeit der Virulenzfaktoren durch Proteasen

Die oben vorgestellten Virulenzfaktoren sind komplizierte, oft aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzte Proteine und Glykoproteine mit z.T. komplexer Tertiär- und Quartärstruktur (Johnson 1991, Neidhardt 1996). An ihrer Zusammensetzung nach der Synthese sind an verschiedenen Punkten auch proteolytische Enzyme beteiligt, so z.B. sog. Leader-Peptidasen (Neidhardt 1996, Eisenbrandt et al. 2000). Die posttranslationale Modifikation von Adhäsinen und anderen Virulenzfaktoren durch Proteasen des Wirts oder des Mikroorganismus selbst ist für mehrere Bakterienarten beschrieben, so u.a. für *Staphylococcus epidermidis* (Veenstra et al. 1996), *Prevotella loeschii* (Cavedon und London 1993) und *Porphyromonas gingivalis* (Kontani et al. 1996). Für UPEC liegen bisher keine publizierten Erkenntnisse vor. Inwieweit und über welche Mechanismen die Anwesenheit eines proteolytischen Enzyms Virulenzfaktoren von *E. coli* verändern könnte, wird unter 4.4.3 ausführlich diskutiert.

1.3 Harnwegsinfektionen

1.3.1 Definition, Epidemiologie und klinische Einteilung

Als Harnwegsinfektion wird die Anwesenheit von Bakterien, Viren, Pilzen oder anderen vermehrungsfähigen Mikroorganismen in den Harnwegen bezeichnet. Diese kann asymptomatisch verlaufen, aber auch alle Grade einer symptomatischen Infektion bis hin zur Sepsis zeigen. Als signifikante Bakteriurie wird eine Keimzahl von 10^5 /ml im Mittelstrahlurin (Kass-Zahl) bzw. jeder Keimnachweis im steril gewonnenen Blasenpunktionsurin bezeichnet (Hahn et al. 1999).

Die Infektion der Niere und der ableitenden Harnwege ist eine häufige Erkrankung. Die Inzidenz beträgt für die unkomplizierte akute Zystitis der jungen Frau 0,5-

0,7/Personenjahr (Hooton et al. 1996). Eine asymptomatische Bakteriurie liegt bei ca. 5% aller sexuell aktiven Frauen zwischen 18 und 40 Jahren vor. Bei 8 % dieser Frauen geht die asymptomatische Bakteriurie innerhalb einer Woche in einen symptomatischen HWI über. Allerdings persistiert ein *E. coli*-Stamm nur selten über längere Zeit, meistens handelt es sich um relativ kurz andauernde Infektionen. Rezidivierende HWI beruhen in der Mehrzahl der Fälle auf Reinfektionen mit anderen Stämmen (Hooton et al. 2000). Der Infektionsweg ist in 80-90 % der Fälle die Aszension der Bakterien aus dem Anal- bzw. Vaginalbereich. Andere Infektionswege (hämatogen, per continuitatem) sind sehr viel seltener (Hahn et al. 1999).

Die Erkrankungshäufigkeit zeigt eine deutliche Verteilung nach Alter und Geschlecht. Der erste Gipfel der Erkrankungen liegt im Säuglings- und Kleinkindalter, wobei wegen der höheren Rate an Fehlbildungen im Urogenitaltrakt das männliche Geschlecht häufiger betroffen ist. Zwischen dem 3. und 60. Lebensjahr beträgt das Verhältnis männlich : weiblich 1 : 10. Mit der Zunahme obstruierender Erkrankungen beim Mann wie Prostatahypertrophie und Neoplasien im Urogenitalbereich nach dem 60. Lebensjahr ist das Geschlechterverhältnis dann wieder ausgeglichen (Classen et al. 1998).

Die klinische Einteilung berücksichtigt verschiedene Aspekte. Zum einen wird unterschieden zwischen der asymptomatischen Bakteriurie und den symptomatischen Formen. Bei letzteren handelt es sich je nach Ort der Entzündung um eine Zystitis oder eine Pyelonephritis. Die Urethritis ist durch ihre Eigenschaft als mehrheitlich sexuell übertragene Krankheit und das gänzlich andere Erregerspektrum (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Herpes-simplex*-Viren u.a.) davon abgetrennt und soll hier nicht weiter betrachtet werden (Classen et al. 1998, Hahn et al. 1999). Ätiologische Überlegungen führen zur Einteilung in unkomplizierte (i.e. ohne prädisponierende Faktoren) und komplizierte HWI (i.e. mit prädisponierenden Faktoren, v.a. Obstruktionen, s. 1.4.2).

Sehr wichtig für epidemiologische Betrachtungen, aber noch wichtiger hinsichtlich des Erregerspektrums und der sich daraus ableitenden modifizierten Antibiotikatherapie ist die Unterscheidung zwischen ambulant und nosokomial erworbenen Harnwegsinfektionen. Bei im Krankenhaus erworbenen Infektionen nimmt der Anteil von *E. coli* zugunsten anderer, oft multiresistenter Keime wie *Pseudomonas ssp.*, *Kleb-*

siella ssp. und Enterokokken ab (Hahn et al. 1999, Bonadio et al. 2001, Grude et al. 2001).

1.3.2 Prädisponierende und infektionsbegünstigende Faktoren

Im Rahmen pathophysiologischer Überlegungen und epidemiologischer Untersuchungen sind eine Reihe von prädisponierenden Faktoren für die Entstehung von Harnwegsinfektionen erkannt worden. Diese lassen sich zum einen dem Wirt und zum anderen den bereits unter 1.2 dargestellten Virulenzfaktoren des auslösenden Mikroorganismus zuordnen.

Bei den Risikofaktoren des Wirts stehen an erster Stelle Fehlbildungen und Obstruktionen im Urogenitaltrakt. Weiterhin bedeutsam sind prädisponierende Erkrankungen wie ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus, allgemeine Abwehrschwäche und Immunsuppression (Tseng et al. 2002). Pubertät, Schwangerschaft und Postpartalphase bedingen bei Frauen Häufigkeitsgipfel im mittleren Lebensalter (Classen et al. 1998). Das Risiko für die unkomplizierte Zystitis bei jungen Frauen steigt mit dem Ausmaß der sexuellen Aktivität und dem Einsatz bestimmter Verhütungsmittel wie Spermizide und Diaphragmen (Hooton et al. 1996).

Für den klinischen Alltag sehr wichtig und ein wesentlicher Grund für Krankenhausmorbidity und –mortality sind die Faktoren, die die Entstehung von nosokomialen Harnwegsinfektionen begünstigen: Neben Bettlägerigkeit, Abwehrschwäche und Eingriffen im Urogenitalbereich sind dies vor allem transurethrale und suprapubische Dauerkatheter. Die Rate an katheterassoziierten Infektionen wird für transurethrale Katheter mit 3-5(-10) % der Patienten pro Tag angegeben (Warren 1997, Saint und Lipsky 1999). Nach 7 Tagen haben ca. 40 %, nach 14 Tagen ca. 80 % der Patienten eine Bakteriurie (Darouiche et al. 1999). Die Wichtigkeit dieses Infektionsherdes zeigt sich unter anderem auch daran, dass ein Wechsel des Blasenkatheters bei Beginn der antibiotischen Therapie die Sanierungsergebnisse gegenüber einer alleinigen Antibiotikagabe signifikant verbessert (Raz et al. 2000). Trotz der Verfügbarkeit von Antibiotika ist dieses Problem auch weiterhin nicht zufriedenstellend gelöst. Versuche, über eine Imprägnierung der Katheter mit Minocyclin und Rifampicin eine Infektion zu verhindern, führten zwar zu einer deutlichen Reduktion der Infektionsrate mit grampositiven Keimen, konnten aber die Keimaszension nicht verhindern; die Rate an gramnegativen Infektionen blieb ebenfalls unbeeinflusst (Darouiche et al. 1999). Die Keimaszension findet dabei offensichtlich sowohl an der Außenseite des

liegenden Katheters (ca. 66 %) als auch im geschlossenen Teil des Kathetersystems (ca. 34 %) statt; der Mechanismus ist dabei unabhängig vom Geschlecht der Patienten (Tambyah et al. 1999).

1.3.3 Abwehrmechanismen des Wirts

Eine Reihe von anatomischen und physiologischen Gegebenheiten des Wirtsorganismus wirken einer Infektion der Harnwege entgegen. Die Peristaltik der Uretheren und der daraus resultierende nach außen gerichtete Harnstrom erschwert eine Anheftung der Bakterien an das Urothel. Das Urothel wird von einer Schicht Glykoproteine bedeckt, dem Uromukoid, die über ein Verdecken der Rezeptoren an der Zelloberfläche die Adhärenz erschwert. Das Urinmilieu wirkt durch hohe Salzkonzentration, Anwesenheit von Harnstoff und niedrigen pH-Wert hemmend auf das Bakterienwachstum (Schilling et al. 2001, Ölschläger et al. 2002). Ein niedriger pH-Wert hemmt außerdem die Adhärenz der Bakterien, was wahrscheinlich auf eine verminderte Expression der Fimbrien zurückzuführen ist (Schmidt 1997). Zudem bindet das im distalen Tubulus sezernierte Tamm-Horsfall-Protein an Typ1-Fimbrien und verhindert deren Bindung an die Rezeptoren Uroplakin Ia und Ib (Pak et al. 2001). Auch die Bindung von P- und S-Fimbrien an Tubulusepithelien lässt sich in vitro durch das Tamm-Horsfall-Protein hemmen (Lecker et al. 1997). Damit wird das Ausschwemmen der Erreger mit dem Harnstrom erleichtert. Sofern schon einmal Kontakt mit der Erregerart bestanden hat, liegt auch sezerniertes IgA vor (Schilling et al. 2001). Als ein weiterer Bestandteil der unspezifischen Abwehr wird die Apoptose und nachfolgende Exfoliation der Urothelzellen diskutiert, die durch adhärierende *E. coli* ausgelöst wird (Mulvey et al. 1998).

Im weiteren Verlauf der Infektion greifen dann die zellulären und humoralen Teile der Immunantwort ein: Zum einen kommt es zur Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten, zusätzlich wird das Komplement aktiviert; zum anderen werden spezifische Antikörper (IgM und IgG) gegen Oberflächenstrukturen der Bakterien gebildet, die die Erreger opsonieren und darüber eine Phagozytose und gezielte Zerstörung durch Zellen des Immunsystems ermöglichen (Schilling et al. 2001). Diese spezifische Immunantwort ist ausgeprägt bei Entzündungen des Nierenparenchyms und bei komplizierten Infektionen, bei unkomplizierten Zystitiden hingegen nur schwach nachzuweisen. Bei Infektionen zeigen Urothelzellen eine deutliche Sekreti-

on von Interleukinen (IL-6, IL-8), Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α) und anderen Zytokinen. Damit wird ebenfalls eine Abwehrreaktion gesteuert (Fünfstück et al. 2001).

1.4 Infektionsmechanismus

1.4.1 Adhärenz

Die Adhärenz, d.h. das Anheften eines Erregers an eine Oberfläche, ist ein essentieller Schritt in der Infektion von Schleimhäuten und bei Bakterien, Pilzen, Viren und einigen Parasiten weit verbreitet (Johnson 1991, Patrick und Larkin 1995). Sie schützt die Erreger davor, von vorbeiströmender Flüssigkeit oder durch peristaltische Bewegungen fortgespült zu werden und ermöglicht überhaupt erst eine Kolonialisierung und nachfolgende Infektion der Schleimhäute. Die für die Adhärenz nötigen Virulenzfaktoren werden Adhäsine genannt; nach ihrer Form werden sie in fimbriale und afimbriale Adhäsine eingeteilt (s. 1.2). Auf Seiten des Wirts müssen diese Adhäsine die entsprechenden Rezeptoren finden; die unterschiedliche Verteilung solcher Rezeptoren erklärt zum Teil die relative Organspezifität vieler Erreger. Gleichzeitig verfügen die meisten Stämme über mehrere verschiedene Adhäsine (Johnson 1991). Im Wirtsorganismus führt die Adhärenz von Erregern zur Auslösung einer Kaskade von Abwehrreaktionen. Über die Aktivierung des Glykosphingolipid-Rezeptors in Verbund mit dem Toll-like-Rezeptor 4 auf den Urothelzellen können sowohl das Lipopolysaccharid als auch P-Fimbrien allein eine Entzündung auslösen, die zur Zerstörung des Epithels und damit zur Beendigung der Infektion führt (Frendéus et al. 2001). Die Adhärenz der Bakterien führt im Tiermodell innerhalb weniger Stunden zu einer Apoptoseinduktion; dadurch wird die Zahl der im Urogenitaltrakt vorhandenen Erreger um über 80 % verringert. Allerdings liegen dann Strukturen der extrazellulären Matrix frei, an die wiederum eine Anheftung möglich ist (Mulvey et al. 1998). Auf die Sekretion von Zytokinen wurde schon unter 1.3.3 eingegangen.

1.4.2 Internalisierung

Seit langem sind Bakterien bekannt, deren pathogenetisches Prinzip im Eindringen in Zellen und Zellverbände des Wirts besteht; dieses ist vor allem für enteropathogene Erreger wie enteroinvasive *E. coli*, *Shigella* ssp., *Salmonella* ssp. usw. gut belegt (Galán et al. 1992, Bliska et al. 1993, Pace et al. 1993). In den vergangenen zehn Jahren hat sich auch zunehmend die Bedeutung der Internalisierung von anderen,

eigentlich nicht als invasiv bekannten Erregern, wie z.B. uropathogenen *E. coli*, herausgestellt (Straube et al. 1992, Finlay und Cossart 1997).

Die Internalisierung erfolgt durch Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, unter anderem über die Aktivierung von G-Proteinen und über einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration; dieses resultiert in einer komplexen Umorganisation von Teilen des Zytoskeletts (Bliska et al. 1992; Finlay und Cossart 1997). Offensichtlich sind verschiedene Virulenzfaktoren in der Lage, gezielt eine Internalisierung auszulösen (Finlay und Cossart 1997, Jouve et al. 1997, Martinez et al. 2000, Ölschläger et al. 2002).

Die Bedeutung der Internalisierung für die Pathogenese liegt vor allem darin, dass die Bakterien der unmittelbaren Immunantwort des Wirts entgehen und in den Zellen gute Vermehrungsbedingungen vorfinden. Außerdem erleichtert die Internalisierung in vielen Fällen ein Überschreiten von anatomischen Grenzen, z.B. der Epithelgrenze im Urogenitaltrakt oder der Blut-Hirn-Schranke (Finlay und Cossart 1997).

Eine quantitative Bewertung der Bedeutung einer Internalisierung für HWI wurde u.a. von Mulvey et al. im Tierexperiment demonstriert: Zwei Stunden nach Beginn der Infektion sind weniger als 0,5 % aller im Harntrakt vorhandenen Bakterien internalisiert. Die absolute Zahl bleibt dann aber über die nächsten Tage stabil, während die Zahl der adhärennten Bakterien immer weiter abnimmt. So kommt der Internalisierung nach Auffassung der Autoren eine essentielle Bedeutung für die Persistenz einer Infektion zu. Auch das Entstehen von klinisch so aufgefassten Frührezidiven ist in ca. 33-66 % der Fälle durch den selben Bakterienstamm ausgelöst und somit in einigen Fällen eher als ein schleichender Verlauf der Primärinfektion denn als Reinfektion anzusehen (Mulvey et al. 1998).

1.4.3 Mögliche Angriffspunkte von Proteasen im Infektionsmechanismus

Neben der möglichen Beeinflussbarkeit der Virulenzfaktoren (s. 1.2.9) gibt es viele weitere Angriffspunkte, an denen Proteasen in den frühen Verlauf eines HWI eingreifen können. Erstens ist analog zu einer proteolytischen Modifikation der Bakterienantigene auch eine posttranslationelle Veränderung von Rezeptorstrukturen auf den Wirtszellen denkbar. Auch die Freilegung von ansonsten verborgenen Rezeptoren bzw. Adhäsinen ist möglich.

Viele Stämme von *E. coli* und *Salmonella* ssp. sind in der Lage, über Laminin-bindende Fimbrien menschliches Plasminogen "einzufangen" und so ihre Virulenz zu steigern, indem sie Basalmembranen und andere physiologische Barrieren des Wirts hydrolysieren (Lähteenmäki et al. 1995, Korhonen et al. 1997, Kukkonen et al. 1998). Ferner ist eine verstärkte Expression von Virulenzfaktoren denkbar, wie sie für UPEC bei verschiedenen widrigen Umweltbedingungen beschrieben ist. Die näheren Ausführungen zu den genannten Hypothesen finden sich in Kap. 4.3 und 4.4.

1.4.4 Bedeutung von Wachstumsfaktoren für die Adhärenz und Internalisierung

Galán et al. zeigten 1992, dass Salmonellen bei der Invasion in Epithelzellen den Rezeptor für humanen Epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) benutzen (Galán et al. 1992). EGF ist an vielen Stellen des Körpers zu finden; u.a. wird er auch im Urin in relativ hohen Konzentrationen von 1500 bis 1700 ng/h ausgeschieden. Wahrscheinlich wird er in den Nieren und/oder den ableitenden Harnwegen synthetisiert und sezerniert (Callegari et al. 1988). Untersuchungen im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Jena zeigten, dass die Zugabe von EGF, Insulin und anderen Wachstumsfaktoren die Adhärenz und Internalisierung der auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli*-O18-Stämme deutlich steigert. Das Ausmaß der Steigerung variiert je nach untersuchter Zelllinie: Bei T24-Zellen wird die Internalisierung ca. um den Faktor 2 gesteigert, bei Hep2-Zellen ist eine 1000fache Steigerung messbar (Schneider und Schubert 1999, Straube et al. 2000).

1.5 Elastase

1.5.1 Vorkommen und biochemische Eigenschaften

Das in den meisten Säugetierorganismen in verschiedenen Isoformen vorliegende Enzym Elastase ist eine Endopeptidase, die bevorzugt die Bindungen an der Carboxylgruppe von Glycin, Valin, Alanin, Leucin und Isoleucin hydrolysiert. Außerdem, und das ist das namensgebende Charakteristikum, spalten die Enzyme der Elastasegruppe Elastin. Im menschlichen Körper sowie in den meisten Säugetierorganismen kommen im Wesentlichen zwei Isoformen vor: Die vom Pankreas verschiedener Organismen sezernierte Pankreas-Elastase (EC-Nummer 3.4.21.36) und die in Zellen des Immunsystems (v.a. neutrophilen Granulozyten) und der Milz synthetisierte

Leukozyten-Elastase (EC-Nummer 3.4.21.37, Synonyme: lysosomale Elastase, Neutrophilen-Elastase, humane Granulozyten-Elastase, Polymorphnukleären-Elastase). Obwohl zwischen den einzelnen Pankreas-Elastasen je nach Ursprungsorganismus Unterschiede in der Aminosäuresequenz bestehen, werden sie wegen der großen Übereinstimmungen hinsichtlich Substratspezifität und biochemischer Eigenschaften alle unter derselben EC-Nummer subsumiert (Schomburg und Salzmann 1991). Die wichtigsten biochemischen Eigenschaften sind Tab. 1.1 zu entnehmen. Abb. 1.1 zeigt dreidimensionale Modelle der porkinen Pankreas-Elastase und der humanen Leukozyten-Elastase (aus Cregge et al. 1998 in *The Protein Data Bank* [Berman et al. 2000]).

	Molekulargewicht (Da)	pH-Bereich ¹	pH-Optimum	Temperatur-optimum (°C)
Pankreas-Elastase	21000-30000	7,3-9,2	8,3-8,7	37-40
Leukozyten-Elastase	30000-35000	5,5-10	8,2-9,2	37

¹ Bereich mit 50% der maximalen Aktivität

Tab.1.1: Chemische Eigenschaften der beiden Elastase-Isoenzyme (aus Schomburg und Salzmann 1991)

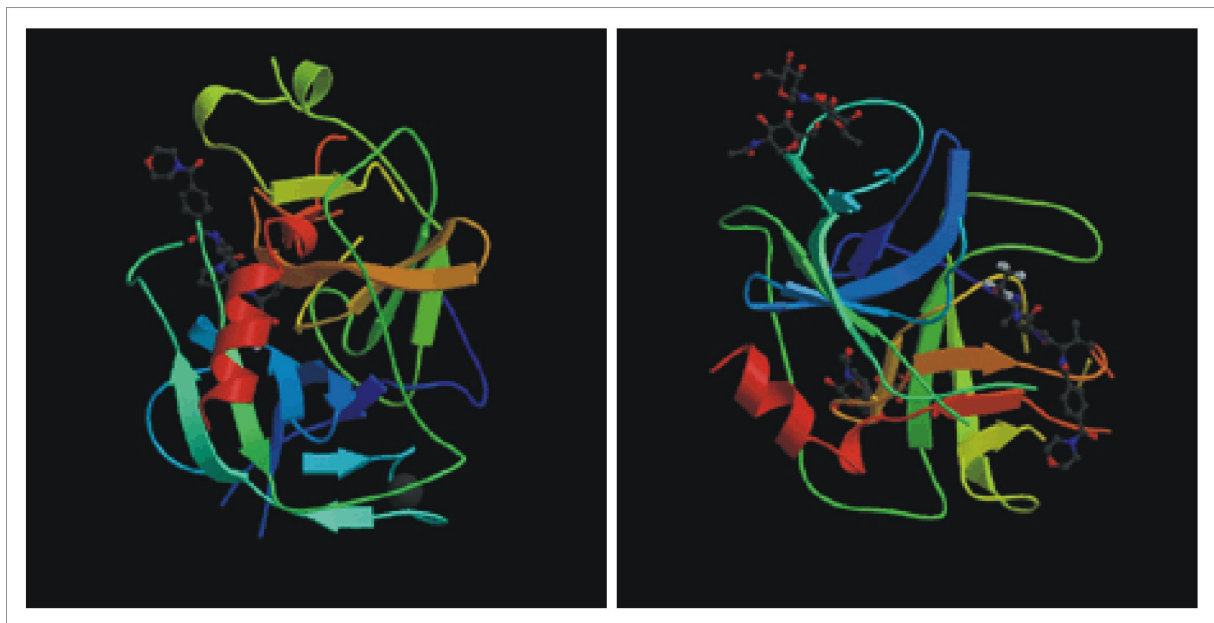


Abb. 1.1: 3D-Modelle der porkinen Pankreas-Elastase (links) und der humanen Leukozyten-Elastase (rechts), erstellt über eine Röntgen-Diffraktion (aus *The Protein Data Bank* [Berman et al. 2000]).

Die Pankreas-Elastase wird als inaktives Proenzym in den Azinuszellen des Pankreas produziert und gelangt mit dem Drüsensekret in das Lumen des Verdauungstrakts. Im Duodenum wird das Proenzym durch Trypsin gespalten und in seine aktive

Form überführt. Der menschliche Stuhl enthält entsprechend eine erhebliche Menge aktiver Elastase (Lembcke 1998). Die Leukozyten-Elastase wird in den Lysosomen der immunkompetenten Zellen gespeichert und dient dort zum einen dazu, phagozytierte Bakterien zu zerstören. Zum anderen wird sie in die Umgebung der Immunzellen sezerniert, wo sie ebenfalls proteolytisch aktiv ist. Die Substratspektren der beiden im menschlichen Körper vorkommenden Enzyme sind zumindest *in vitro* sehr ähnlich (Starkey und Barrett 1976, Schomburg und Salzmann 1991).

Wegen der großen Reaktivität mit körpereigenen Strukturen (s. 1.6.2) wird im gesunden Organismus jede freigesetzte Leukozyten-Elastase mit Hilfe von α 1-Antitrypsin und α 1-Antichymotrypsin (neuerdings mit weiteren Proteaseinhibitoren zu α 1-Proteaseinhibitor zusammengefaßt), beides potente körpereigene Inhibitoren verschiedener Proteinasen, innerhalb kurzer Zeit komplexiert und damit die proteolytische Aktivität kontrolliert. Die Konzentration dieses Komplexes (Leukozyten-Elastase- α 1-Protease-Inhibitor-Komplex, im folgenden mit E- α 1-PIK abgekürzt) kann im Serum, im Urin und in weiteren Körperflüssigkeiten gemessen werden und dient so zum einen einer indirekten Abschätzung der Granulozytenaktivität, zum anderen als experimenteller Marker für verschiedene Entzündungen, insbesondere für rheumatische Erkrankungen (Momohara et al. 1997), HWI (Fretzayas et al. 2000, Bakakos et al. 2002) und beim Hämolytisch-urämischem Syndrom (Ishikawa et al. 2000).

Enzyme mit elastolytischer Aktivität sind auch bei Prokaryonten bekannt, u.a. bei *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* und *Aspergillus fumigatus* (Spierer und Kessler 1984, Twining et al. 1986, Iadarola et al. 1998, Britigan et al. 1999, Cascón et al. 2000). Die pathogenetische Bedeutung dieser Proteasen ist unter 1.5.2 ausgeführt.

Für die Versuche wurde Elastase aus Schweinepankreas (Hausschwein, *Sus scrofa*) verwendet, da sie in ihren *in vitro*-Eigenschaften mit der Leukozyten-Elastase und der humanen Pankreas-Elastase gut vergleichbar (Starkey und Barrett 1976, Powers et al. 1977), aber sehr viel einfacher einzusetzen und preisgünstiger ist. Dieses Verfahren wird auch von anderen Autoren praktiziert (Moore et al. 1999).

1.5.2 Bedeutung der Elastase für Entzündungsgeschehen und Immunabwehr

Die Bedeutung der Elastase für das Entzündungs- und Infektionsgeschehen ist in den letzten Jahrzehnten eingehend untersucht worden. Dabei ist eine Fülle von Erkenntnissen gewonnen worden, die zur Zeit nur eine kontroverse Beurteilung erlauben und ein ausgesprochen differenziertes Bild der physiologischen und pathophysiologischen Funktion dieser Enzymgruppe ergibt.

Seit langem ist bekannt, dass die Pankreas-Elastase bei einem Verschluss des Pankreasausführungsgangs eines der Enzyme ist, das bei der folgenden akuten Pankreatitis über eine Gefäßzerstörung eine hypoxische Nekrose verursacht und die Autodigestion des Organgewebes katalysiert (Stommer 1982). Eine mangelnde Sekretion führt zu einem gestörten Abbau von Elastin und trägt damit zum Bild der Maldigestion bei (Classen et al. 1998).

In den vergangenen Jahren rückte die Bedeutung der humanen Leukozyten-Elastase in den Blickpunkt der Forschung. Eines der untersuchten Organsysteme ist dabei der Urogenitaltrakt. Bei gesunden Kontrollpersonen wird eine niedrige Konzentration von Elastase bzw. des E- α 1-PIK im Urin gefunden (Oda et al. 1997, Fretzayas et al. 2000, Bakakos et al. 2002). Da der Inhibitor mit ca. 110 kDa zu groß für eine glomeruläre Filtration ist, ist im Urin gefundener E- α 1-PIK sehr wahrscheinlich im Rahmen einer direkten Sekretion dorthin gelangt (Fretzayas et al. 2000). Bei HWI ist die Konzentration von E- α 1-PIK im Urin und im Serum deutlich erhöht; die Konzentration dieses Elastase-Inhibitor-Komplexes spiegelt, wie bereits unter 1.5.1 ausgeführt, die Freisetzung von Leukozyten-Elastase durch Granulozyten wider. Bakakos et al. zeigten, dass bei Neugeborenen die Konzentration von E- α 1-PIK im Urin innerhalb der ersten Stunden eines HWI auf das 10-20fache seiner Ausgangskonzentration ansteigt und unter einer wirksamen antibiotischen Therapie nach 72 Stunden bereits wieder deutlich absinkt. Die Konzentration des E- α 1-PIK im Urin stellt damit nach Ansicht der Autoren nicht nur einen Test mit hoher Sensitivität und Spezifität für akute HWI bei Neugeborenen dar, sondern bietet auch einen empfindlichen Marker für persistierende Infektionen unter antibiotischer Therapie. Die Konzentration des E- α 1-PIK im Plasma war in dieser Studie nur bei Patienten mit Sepsis signifikant erhöht (Bakakos et al. 2002). Andere Autoren fanden hingegen, dass die Konzentration des

E- α 1-PIK im Serum auch ein sensitiver Marker für eine akute Pyelonephritis bei Kindern ist; die Spezifität hingegen ist gering (Fretzayas et al. 2000). Auch beim Hämolytisch-urämischem Syndrom ist die Konzentration des E- α 1-PIK im Serum der Patienten signifikant erhöht (Ishikawa et al. 2000). Untersuchungen für HWI bei Erwachsenen sind bisher nicht publiziert worden.

Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Beteiligung an der extrakapillären Glomerulonephritis. Leukozyten-Elastase konnte extrazellulär in Läsionen mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden. Die Konzentration der Elastase im Urin stieg bei erkrankten Patienten um den Faktor 70-80 gegenüber gesunden Kontrollpersonen (Oda et al. 1997). Offensichtlich ist also die Elastaseaktivität auch bei HWI von Bedeutung für das Entzündungsgeschehen, vor allem bei oberen HWI und septischen Krankheitsbildern. Die erhöhte Konzentration von E- α 1-PIK im Urin bei fehlender glomerulärer Filtrierbarkeit spricht für eine Anwesenheit von Elastase auch im Urin am Ort der Entzündung.

Ferner wurde von mehreren Autoren gezeigt, dass die humane Leukozyten-Elastase, neben vielen anderen Proteasen, auch bei verschiedenen chronischen Erkrankungen mit Destruktionen und fibrotischen Umbauvorgängen in parenchymatösen Organen beteiligt ist. So maßen Sepper et al. bei schweren Fällen von Bronchiektasen eine zehn- bis zwölffach höhere Elastaseaktivität in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) als bei gesunden Personen und führten dies auf die Erschöpfung und eventuell auch proteolytische Zerstörung des Antiproteinasen-Pools zurück (Sepper et al. 1995). Bei Patienten mit Cystischer Fibrose besteht eine erhöhte Freisetzung von Leukozyten-Elastase aus den Neutrophilen in der BAL, die über $\text{TNF}\alpha$ und IL-8 vermittelt wird und damit direkt mit der chronischen Entzündung in den Bronchien und Bronchiolen in Zusammenhang steht. Die Freisetzung von Leukozyten-Elastase lässt sich durch die gleichzeitige Inkubation der Neutrophilen mit BAL-Flüssigkeit und opsonierten *E. coli* noch weiter steigern (Taggart et al. 2000).

Bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, wie z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis, konnte in der Synovialflüssigkeit der betroffenen Gelenke eine erhöhte Aktivität von Proteasen, unter anderem der Leukozyten-Elastase, nachgewiesen werden. Diese zerstört zusammen mit Cathepsin G sehr potent die Proteoglykane und das Kollagen des Gelenkknorpels; Elastase hydrolysiert darüber hinaus Kollagen Typ I in Sehnen und Haut (Starkey et al. 1977). Die Konzentration von E- α 1-PIK im Serum

und die Elastaseaktivität in der Gelenkflüssigkeit korrelieren bei der Rheumatoiden Arthritis mit dem Schweregrad der Gelenkdestruktion; die Erhöhungen sind signifikant gegenüber anderen rheumatischen Erkrankungen wie der Osteoarthritis und auch gegenüber der Gicht (Momohara et al. 1997).

Neben diesen verschiedenartigen Funktionen in der Pathogenese chronischer Erkrankungen ist die Beteiligung an akuten und perakuten Veränderungen Gegenstand der Forschung. So spielen die aktivierten Proteasen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) (Carney et al. 2001) und der Säureschädigung von Geweben, z.B. der Lunge (Kaneko et al. 1997). Darüber hinaus vermittelt die Leukozyten-Elastase im Tierexperiment die exzessive Schleimproduktion des respiratorischen Epithels nach Endotoxinbelastung (Shimizu et al. 2000).

Wie oben bereits erwähnt, finden sich Proteasen mit elastolytischer Aktivität auch als Virulenzfaktoren bei einigen Bakterien und Pilzen. Einige Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* produzieren eine Elastase, die einen wichtigen Virulenzfaktor z.B. bei Keratitiden darstellt (Spierer und Kessler 1984; Twining et al. 1986). Die Elastase entfaltet proinflammatorische Wirkung und ist in der Lage, außer Bindegewebsstrukturen auch Immunglobuline, Komplementfaktoren und Zytokine zu hydrolysieren (Kon et al. 1999). Außerdem inaktiviert bei respiratorischen Infektionen das sekretorische Produkt Pyocyanin von *Pseudomonas aeruginosa* den α 1-Protease-Inhibitor in der Lunge, der für die Aktivitätskontrolle der körpereigenen Serinproteasen unerlässlich ist. Dies wird als eine der Ursachen der fortschreitenden Parenchymdestruktionen bei der Cystischen Fibrose angesehen (Britigan et al. 1999). Eine sezernierte Elastase ist auch ein wesentlicher Virulenzfaktor von *Aeromonas hydrophila* und für die Pathogenität dieses Keims entscheidend (Cascón et al. 2000). *Aspergillus fumigatus* produziert eine Serinprotease, die neben anderen Bindegewebsproteinen menschliches Elastin mit einer höheren Aktivität hydrolysiert als menschliche Leukozyten-Elastase und im Tierexperiment bei Mäusen zu einer deutlichen Gewebedestruktion im tiefen Respirationstrakt führt (Iadarola et al. 1998).

Diese Befunde gaben Anlass zu mehreren Untersuchungen, die den therapeutischen Einsatz von Elastaseinhibitoren bei chronisch-destruktiven Erkrankungen erprobten. Es wurden mehrere oral verfügbare Inhibitoren am Tiermodell getestet (Vincent et al. 1996). Eine doppelblind-randomisierte, placebokontrollierte Studie untersuchte den

therapeutischen Effekt bei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) (Luisetti et al. 1996). Die Ergebnisse waren indifferent: Zwischen den beiden Patientengruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich biochemischer Lungendestruktionsmarker im Serum und Urin finden, lediglich bei einer Subgruppe mit kurzer Krankheitsdauer war eine Verbesserung der Parameter einer Gewebeerstörung zu sichern. Sokol et al. immunisierten Ratten mit Peptiden der von *P. aeruginosa* sezernierten Elastase und konnten dadurch das Ausmaß und den Verlauf experimenteller Lungeninfektionen mit *P. aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* positiv beeinflussen (Sokol et al. 2000). Die Gabe des Elastaseinhibitors ONO-5046 vermindert im Tierexperiment bei Kaninchen die Lungen- und Organschädigung durch Säuregabe; die Einwanderung von Neutrophilen wird nicht verändert, aber der Inhibitor bremst offensichtlich die proteasenvermittelte Gewebszerstörung in der zweiten Phase der Säurebelastung und verbessert die Lungenfunktion (Kaneko et al. 1997). In eine ähnliche Richtung gingen die Ergebnisse von Carney et al., die mit dem Einsatz des Proteaseinhibitors COL-3, einem modifizierten Tetrazyklin, im Tierexperiment den Verlauf des ARDS nach Lipopolysaccharid-Gabe deutlich positiv beeinflussen konnten und sogar die einmalige prophylaktische Gabe von COL-3 bei allen Traumapatienten analog zur Ulcus- und Thromboseprophylaxe vorschlugen (Carney et al. 2001). Untersuchungen zur Wirkung von Proteaseinhibitoren auf HWI existieren bisher nicht.

Ein Problem dieser Untersuchungen, zumal der klinischen Studien, ist die Diskrepanz zwischen einer sehr kurzen, oft nur wenige Tage oder einer einmaligen Gabe dauernden Therapie bei akuten Erkrankungen (ARDS, septischer Schock) und wenigen längeren Untersuchungen bei chronischen Erkrankungen. Es liegen daher kaum Erkenntnisse über die Auswirkungen auf bakterielle Infektionen vor. Einen gewissen Hinweis auf mögliche Interaktionen liefern die Ergebnisse von Spierer und Kessler für den Einsatz von Elastaseinhibitoren bei der Keratitis durch *Pseudomonas aeruginosa* im Tierversuch. Dort zeigte sich in der Anfangsphase eine deutliche Reduktion der Virulenz und damit der Organschäden, allerdings verschwand dieser Vorteil bei fortgesetzter Applikation nach 48 Stunden. Die Autoren schlussfolgerten, dass es zunächst zu einer gewünschten Hemmung der Elastase von *Pseudomonas aeruginosa* kam. Diese Hemmung betraf dann aber, so ihre Hypothese, auch die eingewanderten neutrophilen Granulozyten und in der Folge deren zur Erregerabwehr nötige Elastase (Spiierer und Kessler 1984).

Die Leukozyten-Elastase spielt eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr, insbesondere gegen gramnegative Erreger. Belaaouaj et al. infizierten Leukozyten-Elastase-defiziente Knock-out-Mäuse intraperitoneal mit *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* und fanden eine zehnfach niedrigere tödliche Dosis (LD₅₀) für gramnegative Bakterien bei den Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Belaaouaj et al. 1998). Den Grund dafür sahen sie in einer Funktionseinschränkung der neutrophilen Granulozyten: Die Phagozytose geschah uneingeschränkt, aber die Zerstörung der gramnegativen Bakterien war deutlich verringert. Die Reaktion der Mäuse gegen *Staphylococcus aureus* war hingegen nicht verändert. In einer späteren Arbeit zeigten die Autoren, dass die Leukozyten-Elastase gezielt das äußere Membranprotein A (outer membrane protein A, OmpA) von *E. coli* katalysiert. OmpA-defiziente *E. coli* entgingen diesem Angriff der körpereigenen Abwehr (Belaaouaj et al. 2000). Ein weiterer Effekt der Leukozyten-Elastase liegt in der Aktivierung kleiner, bakterizid wirkender Peptide, sogenannter Cathelicidine, Pro-tegrine, Defensine u.a., die neben den großen enzymatisch wirkenden Proteinen aus aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden. Shi und Ganz zeigten, dass diese Stoffe in entzündlichen Flüssigkeiten von Schweinen durch Leukozyten-Elastase aktiviert werden müssen, um bakterizid wirken zu können; in Gegenwart eines spezifischen Elastaseinhibitors entwickelte sich keine Bakterizidie gegen *E. coli* oder *Listeria monocytogenes* (Shi und Ganz 1998).

1.6 Fragestellung und Konzeption der Versuche

In Anbetracht der dargestellten kontroversen Befunde kann von einem abschließenden Bild der Proteasenfunktion bei entzündlichen Vorgängen nicht gesprochen werden. Im Laufe der Evolution haben die Erreger ein großes Repertoire von Virulenzfaktoren entwickelt, um sich möglichst gut an das Überleben im Wirtsorganismus und in der Umwelt anzupassen. Die Wirte haben im Gegenzug eine subtile und auf viele verschiedene Mechanismen gestützte Immunantwort ausgebildet. Auf diese haben die Erreger wiederum reagiert, sodass sich Infektionen, insbesondere in höher entwickelten Eukaryonten, als ein kompliziertes Geschehen von Aktion und Reaktion auf beiden Seiten präsentieren. Die Einzelheiten dieser Vorgänge sind noch lange nicht umfassend und zufriedenstellend bekannt.

In dieser Dissertation soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit die Anwesenheit von Elastase das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von uropathogenen *E. coli* an T24-Zellen verändert. Dieses Infektionsmodell ist gut etabliert und bietet eine einfache Möglichkeit, die Interaktionen zwischen Bakterien und Wirtszellen, hier in einer Zellkultur, zu untersuchen (Straube et al. 1993, Ölschläger et al. 1994, Straube et al. 2000). Dabei bleibt die experimentelle Anordnung auf die Adhärenz und Internalisierung fokussiert; der Einfluss einer ganzen Reihe von Störfaktoren, wie z.B. anatomische Gegebenheiten, Immunsystem des Wirts usw., wie sie im Tierexperiment vorliegen, bleibt kontrollierbar bzw. wird ausgeschaltet. Als weiteres Reagenz wurde EGF eingesetzt, da die Anwesenheit dieses Wachstumsfaktors die sonst nur recht schwache Adhärenz und Internalisierung an T24-Zellen steigert (Schneider und Schubert 1999, Straube et al. 2000). Die gewählten Konzentrationen von 2–20 ng/ml lagen im als effektiv bekannten Bereich.

Zur Untersuchung des Elastaseeffekts wurden die verschiedenen denkbaren Angriffspunkte der Protease getrennt untersucht. So wurden in der ersten Versuchsanordnung die Bakterien mit Elastase vorbehandelt und die Zellen nach Abwaschen und Zentrifugieren der Bakterien infiziert. In weiteren Versuchsanordnungen wurden zum einen die Zellen vorbehandelt, dann gewaschen und infiziert, zum anderen wurde Elastase dem Infektionsansatz zugegeben. Die Wahl der Aktivität der Elastase (A_{Ela}) orientierte sich an den in der Literatur angegebenen Aktivitäten in verschiedenen Körperflüssigkeiten und lag je nach Versuchsansatz bei 0,05–0,1 U/ml (Sepper et al. 1995).

Da sich, wie in Kapitel 3 und 4 noch näher ausgeführt, eine Steigerung von Adhärenz und Internalisierung durch die Anwesenheit von Elastase zeigte, wurden einige weitere Experimente zur Klärung dieses Effekts durchgeführt. Zum einen wurde versucht, eventuell an der Bakterienoberfläche gebundene Elastase mittels Antikörper zu markieren (indirekte Immunfluoreszenz und Dotblot). Zum anderen wurde das proteolytische Verhalten behandelter Bakterien gegenüber Azocasein untersucht. Um auszuschließen, dass allein die Anwesenheit von Elastasemolekülen die Makropinozytose von ansonsten inerten Partikeln fördert, wurden Latexpartikel mit Elastase beladen und deren Aufnahme in T24-Zellen mit der Aufnahme von Albumin-beladenen Partikeln verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Reagenzien

2.1.1 Zellen

Für die Versuche wurden T24-Zellen eingesetzt. Dabei handelt es sich um Zellen eines humanen Harnblasentumors (Übergangszellkarzinom Grad III). Die Zelllinie wurde 1970 aus dem Tumor einer 81jährigen kaukasischen Frau etabliert. Bezogen wurde die Linie von der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen*, Braunschweig (Nr. ACC 376).

2.1.2 Bakterien und Kulturmedien

Untersucht wurden vier Stämme von *Escherichia coli* O18, und zwar zwei Wildstämme (2052, 2980) mit jeweils einer isogenen Mutante (2332 bzw. 2313). Die Charakteristiken der wesentlichen Oberflächenantigene sind in Tab. 2.1 aufgelistet.

	O18	K5	H	P- Fimbrien	Typ1- Fimbrien	F1C- Fimbrien	α - Hämolysin
2052	+	+	-	F14	+	+	+
2332 ¹	+	-	-	F14	+	+	+
2980	+	+	5	F8	+	+	+
2313 ²	+	-	5	F8	+	+	-

¹ isogene Mutante von 2052 ² isogene Mutante von 2980

Tab. 2.1: Oberflächencharakteristik der eingesetzten *E. coli*-Stämme (Straube et al. 1993). Afimbriale Adhäsine liegen bei den untersuchten Stämmen nicht vor (A. Käßner, persönliche Mitteilung).

Für die Anzucht der Bakterien wurden folgende Agarplatten verwendet:

- **Winkle-Agar** (selektiver Agar für gramnegative Bakterien, pH 7,3):
 - 1 l Columbia Agar Basis
 - 10 g/l Laktose
 - 0,025 g/l Bromthymolblau- Lösung
- **Loeb-Agar** (pH 7,1-7,2):
 - 10 g/l Bacto-Trypton (Difco) 8 g/l NaCl
 - 1 g/l Hefe- Extrakt 15 g/l Agar
 - 1 g/l Glucose 1 l Aqua dest.
- **Loeb-Agar** unter Zusatz von 0,2 % Calciumchlorid (CaCl₂)

Die Stammhaltung erfolgte auf Loeb-Agar. Die Stämme wurden einmal pro Woche überimpft, für 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert und dann im Kühlschrank gelagert. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die im Versuch verwendeten Stämme auf Loeb- Agar mit 0,2% CaCl₂ überimpft und die Agarplatten dann bei 37°C für 24 h bebrütet. Dieses verstärkt die Expression der Typ1-Fimbrien (Connell et al. 1996).

2.1.3 Materialien

- Zellkulturflaschen und 24-Loch-Zellkulturplatten (Mikrotiterplatten, MTP) (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
- Photometer mit Glasküvetten für Extinktionsmessung zur Konzentrations-einstellung (beides Carl Zeiss Jena)
- Photometer Ultrospec 2000 mit Kunststoffküvetten zur enzymkinetischen Messung (beides Pharmacia Biotech)
- Schüttelschrank TH 25 (Fa. Edmund Bühler)
- Bakterienstandard nach McFarland (BioMérieux, Marcy-l'Etoile/F)
- Sterile Reagenzröhrchen in verschiedenen Größen (Greiner)
- Eppendorf-Tubes in verschiedenen Größen (Eppendorf), sterilisiert.

Blocken der reaktiven Gruppen der Polymeroberflächen: Für alle Arbeiten mit Antikörpern, Fluoreszenzfarbstoffen und Latexpartikeln wurden die Tubes vor ihrer Verwendung für 30 min mit Magermilch 1% in PBS (s. 2.1.4) geblockt und anschließend zwei Mal mit PBS-Tw (s. 2.1.4) gewaschen.

- Objektträger, Deckgläschen verschiedener Größen (Menzel)
- Neubauer-Kammer zur Zellzählung (Brand)
- Nitrozelluloseplatten PROTRAN Nitrozellulose Transfer System, Porengröße 0,2 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Filterpapier 3 (Whatman, Maidstone/UK)
- Indikatorpapier (Merck, Darmstadt)

2.1.4 Reagenzien und Puffer

Alle Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Carl Roth Chemikalien GmbH, Karlsruhe bezogen.

- steriles Aqua dest.: im Haus hergestellt und autoklaviert oder Ampuwa® (Fresenius Kabi, Homburg)

- Dulbecco's Mem mit Glutamax I (i.e. L-Alanyl-L-Glutamin), Glucose 4,5 g/l und Pyridoxin, ohne Na-Pyruvat (Gibco BRL, Paisly/UK), im Folgenden mit *DMEM* abgekürzt.
- Medium 199 (2x) Earle's Mod Salts, mit L-Glutamin, L-Aminosäuren, ohne Phenolrot (Gibco BRL), im Folgenden *M199* genannt. Es wurde zum Einsatz im Verhältnis 1:1 mit sterilem Aqua dest. (Ampuwa®) verdünnt. pH an der Zimmerluft: 7,4
- fetales Kälberserum (FKS) (Gibco BRL)
- Trypsin (0,05 %) - EDTA (0,02 %)-Lösung in PBS, ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom KG)
- PBS- Puffer (Phosphate buffered saline), in folgender Zusammensetzung im Haus hergestellt und autoklaviert:
8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,1 g Na_2HPO_4 ,
0,2 g KH_2PO_4 , gelöst in 1 l Aqua dest .
- PBS-Ma: Magermilch (handelsüblich), zu 10% in PBS gelöst und autoklaviert
- Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat) (Serva Feinbiochemica, Heidelberg)
- PBS-Tw: PBS + 0,01 % Tween 20
- PBS-Ma-Tw: PBS + 1 % Magermilch + 0,01 % Tween 20
- Gentamicin-Sulfat-Lösung (50 mg/ml) steril filtriert (Sigma Cell Culture, St. Louis, MO/ USA)
- Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) (Sigma Cell Culture)
- Elastase aus Schweinepankreas 10 mg Lyophilisat (Roche Diagnostics, Basel/CH)
- Triton X-100 (Alkyl-phenyl-polyethylen-glykol) (FERAK Laborat GmbH, Berlin)
- Latexpartikel (latex beads), Größe $3,04 \pm 0,14 \mu\text{m}$ (Sigma Cell Culture)
- Rinderserumalbumin 30 % (RSA) mit 0,1 NaN_3 als Konservierung (Biotest)
- 0,1 N Natrium-Acetat-Lösung, auf pH 5,5 eingestellt
- Paraformaldehyd 2 % in Aqua dest.
- 0,1 M Glycinlösung, auf pH 2,5 eingestellt
- 1 M Trispuffer, auf pH 10 eingestellt
- Natrium-Thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
- H_2O_2 -Lösung 30 % in Aqua dest.
- Azocasein als Lyophilisat (Fluka, St. Gallen/CH)
- Trichloressigsäure (C_2OOHCl_3) 10%
- Salzsäure (HCl) 10 %, Natronlauge (NaOH) 10 % zur pH- Einstellung

2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe, Antikörper, Färbereagenzien

- FITC (Fluorescein-iso-thiocyanat) (Merck, Darmstadt)
- Anti-Elastase-Antikörper: polyklonaler Antikörper gegen porkine Pankreaselastase vom Kaninchen (Chemicon, Temecula, CA/USA)
- Anti-Kaninchen-Antikörper von der Ziege, FITC- markiert (AB DDR)
- Anti-Kaninchen-Antikörper von der Ziege (IgG, H und L), mit Meerrettich-Peroxidase (POD) markiert (Chemicon)
- Farbreagenz für POD-Reaktion: 3-Amino-9'-Ethylcarbozol, 1 g auf 50 ml Aceton

2.2 Zellkulturen

2.2.1 Herstellung des Nährmediums für die Zellkulturen

Als Nährmedium diente DMEM mit 10% fetalem Kälberserum (FKS). Zur Herstellung wurden 50 ml FKS aufgetaut und dann im Wasserbad bei 56°C in 30 min inaktiviert. Dann wurde es im Verhältnis 1:10 mit DMEM gemischt.

2.2.2 Stammhaltung

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen gezogen. Zum Ablösen wurde das Nährmedium abgenommen, die Flasche einmal mit sterilem PBS gespült und dann der Zellrasen mit 3 ml Trypsin- EDTA- Lösung benetzt. Die Resuspendierung erfolgte in 10 ml Nährmedium. Davon wurden 3 ml in eine neue Flasche überimpft, mit Nährmedium auf 20 ml aufgefüllt und für 48 h im Brutschrank bebrütet (37°C, 5 % CO₂).

Da das Verhalten der T24-Zellen im Infektionsassay ca. ab der 25. Passage instabil wird, wurde bei Erreichen der entsprechenden Passagezahl eine neue Stammhaltung aus tiefgekühlten Zellen etabliert, diese vier Mal passagiert und dann in einem Probeversuch mit drei *E. coli*-Stämmen (üblicherweise 2052, 2313 und 2332) unter Einsatz von EGF (Konzentration 10 ng/ml) getestet. Erst bei Reproduzierbarkeit der bekannten Ergebnisse unter Einsatz von EGF (Straube et al. 2000) wurden die Untersuchungen mit Elastaseeinsatz fortgesetzt.

2.2.3 Zellkulturen in Mikrotiterplatten

Die Zellen wurden wie oben beschrieben abgelöst und in Nährmedium suspendiert. Der Zellgehalt der Lösung wurde durch Auszählen von 16 Feldern einer Neubauer-Kammer bestimmt. Der zur Einstellung der gewünschten Zellkonzentration von 2 x

10^5 Zellen pro Well nötige Verdünnungsfaktor wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Zellzahl} \cdot 10^4}{2 \cdot 10^5}$$

Die errechnete Verdünnung wurde dann mit Nährmedium hergestellt. Von dieser Zellsuspension wurde jeweils 1 ml in jedes Well einer 24-Loch-Mikrotiterplatte (MTP) pipettiert. Die Platten wurden für 48 h bebrütet (37°C, 5 % CO₂). 18 h vor Versuchsbeginn wurde das Nährmedium abgenommen und durch 500 µl serumfreies DMEM ersetzt. Die dadurch erzielte Hungerphase führt zu einer verstärkten Expression der Rezeptoren an der Zelloberfläche und einer Entfernung der im FKS enthaltenen Wachstumsfaktoren, um die nachfolgenden Experimente unter Zugabe von EGF nicht zu verfälschen.

2.3 Elastaseeinsatz

2.3.1 Elastasestammlösungen

Die Elastase lag als Lyophilisat vor und wurde laut Anweisung des Herstellers in 2 ml sterilem Aqua dest. rekonstituiert. Es resultierte eine Konzentration von 5 mg/ml Stammlösung. Die spezifische Aktivität der Lösung beträgt laut Herstellerangaben 130 U/mg, so daß sich eine Aktivität von 650 U/ml für die Stammlösung I ergibt. 1 ml der Stammlösung wurde mit Aqua dest. im Verhältnis 1:3,25 verdünnt, um eine besser einsetzbare Stammlösung II mit einer Aktivität von 200 U/ml zu erhalten. Die Lösungen wurden in sterilen Eppendorf-Tubes zu 500 µl bzw. 50 µl portioniert und bis zur Verwendung bei –18°C aufbewahrt.

2.3.2 Behandlung der Bakterien mit Elastase

Zur Vorbehandlung der Bakterien wurden Elastaselösungen mit der Aktivität 0,1 U/ml in 12 ml-Röhrchen hergestellt (3 µl Stammlösung II auf 6 ml M199, Verdünnung der Elastase 1:2000). In diese Lösung wurden mit einer Öse reichlich Bakterien des zu untersuchenden Stammes suspendiert, gut vermischt und die Ansätze dann für 30 min bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze abzentrifugiert (10 min bei 4000 rpm), der Überstand verworfen, die Pellets mit 6 ml M199 resuspendiert und anschließend wiederum abzentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes und Re-

suspendierung in M199 standen die Bakteriensuspensionen zur Konzentrationseinstellung zur Verfügung.

2.3.3 Behandlung der Zellen mit Elastase

Zur Behandlung der Zellen musste eine niedrigere Elastaseaktivität als zur Behandlung der Bakterien gewählt werden, da die Elastase zu einer enzymatischen Ablösung der Zellen vom Untergrund führt. In den Vorversuchen stellte sich eine Aktivität von 0,05 U/ml ($A_{\text{Ela}} = 0,05 \text{ U/ml}$) als die geeignetste heraus, da sie den besten Kompromiss zwischen noch messbarem Effekt auf Adhärenz und Internalisierung einerseits und möglichst geringer Zellablösung andererseits bildete.

Die Elastaselösung zur Vorbehandlung der Zellen wurde auch hier in M199 hergestellt (4,5 µl Stammlösung II auf 18 ml M199, Verdünnung der Elastase 1:4000). Davon wurden je 1 ml in die Wells der MTP gegeben und für 30 min inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Danach wurde die Elastaselösung abgenommen, die Zellen drei Mal mit PBS gespült und bis zur endgültigen Inkubation mit M199 gepuffert.

2.3.4 Gemeinsame Inkubation von Bakterien und Zellen mit Elastase

Für die Elastase in den Infektionsansätzen wurde, analog zu den in 2.3.3 ausgeführten Überlegungen, ebenfalls eine Aktivität von 0,05 U/ml gewählt. Um diese im Inkubationsansatz zu erreichen, wurde im ersten Schritt eine Elastaselösung mit einer Aktivität von 0,125 U/ml hergestellt (6 µl Stammlösung II auf 9,6 ml DMEM, Verdünnung der Elastase 1:1600). Von dieser Lösung wurden je 2 ml mit DMEM im Verhältnis 1:1 verdünnt (resultierende Elastaseaktivität 0,0625 U/ml). Durch Zugabe von je 1 ml Bakteriensuspension (s. 2.4.1) wurde die gewünschte Aktivität erreicht. Diese Lösung wurde dann zur Bestimmung von Adhärenz und Internalisierung in die MTP zu den Zellen gegeben (s. 2.4.3).

2.4 Bestimmung von Adhärenz und Internalisierung

2.4.1 Einstellen der Bakteriensuspension

Die Bakterien wurden durch Zugabe einer kleinen Menge von Bakteriensuspension (s. 2.4.2) in jeweils 5 ml M199 verdünnt bzw. mit der Öse vom Agar suspendiert und dann mittels eines Photometers auf eine Extinktion von 0.1 bei $\lambda = 640 \text{ nm}$ einge-

stellt. Nach der Verdünnung im Verhältnis 1:5 (s. 2.4.3) resultierte eine Bakterienzahl von ca. 2×10^7 pro ml, also ca. 100 Bakterien pro Zelle (Straube et al. 2000).

2.4.2 Zugabe von EGF

Der EGF lag in einer Konzentration von 100 µg/ml vor. Die Konzentrationen für den Einsatz des EGF in den Adhärenz- und Internalisierungsversuchen lagen bei 2, 10 und 20 ng/ml. Dazu waren folgende Verdünnungsschritte notwendig:

- Schritt I: Verdünnung 1:400 (5 µl EGF auf 2 ml DMEM), resultierende Konzentration = 0,25 µg/ml
- Schritt II: Verdünnung 1:10 (1 ml Stammlösung I auf 9 ml DMEM), resultierende Konzentration = 0,025 µg/ml entsprechend 25 ng/ml.

Stammlösung II wurde dann entsprechend auf die gewünschten EGF-Konzentrationen verdünnt.

2.4.3 Infektionsansätze

In vorbereitete Röhrchen wurden je 4 ml DMEM bzw. 4 ml der entsprechenden EGF-Lösung gegeben. Zu diesen wurde je 1 ml der Bakteriensuspension hinzugefügt, gut vermischt und dann 1 ml pro Well in die MTP pipettiert. Danach wurden die Zellkulturen mit den Bakterien zusammen in der MTP für 1,5 h im Brutschrank bebrütet (37°C, 5% CO₂). Die MTP wurde dann geteilt: Eine Hälfte diente zur Adhärenz-, die andere zur Internalisierungsbestimmung.

2.4.4 Bestimmung der Adhärenz

Nach der Inkubation wurden die Infektionsansätze abgesaugt und die Wells je fünf Mal mit PBS gespült. Dann wurden durch Zugabe von je 1 ml PBS + 1 % Triton X-100 innerhalb von 15 min die Zellen zerstört. Nach der Resuspendierung der Zelltrümmer und Bakterien mit der Pipette wurden je 50 µl der Suspension im Verhältnis 1:100 in PBS verdünnt und davon dann je 100 µl auf Winkle-Agar-Platten ausgespalt. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Deren Anzahl mit 1000 multipliziert ergab die Zahl der koloniebildenden Einheiten (cfu/ml).

2.4.5 Bestimmung der Internalisierung

Nach Absaugen und Spülen wie bei der Adhärenz-Bestimmung wurde je 1 ml Gentamicinlösung (100 µg/ml in DMEM) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden diese Ansätze für 1 h bei Zimmertemperatur (ZT) inkubiert. Dadurch kam es zu einer (weitgehenden) Abtötung der extrazellulär gelegenen Bakterien, wogegen die intrazellulär gelegenen, also internalisierten *E. coli*, von Gentamicin in dieser Konzentration nicht erreicht wurden. Nach der Inkubation wurde die Gentamicin-Lösung abgenommen und die Wells wurden drei Mal mit PBS gespült. Von der dritten Spülung wurden aus jeder Meßreihe eine Probe von 100 µl abgenommen und auf Winkle-Agar-Platten ausgetropft, um so eine Kontrolle der Gentamicin-Wirkung zu haben (zur Bewertung der Kontrollen s. 2.10.1). Nach der Spülung wurden die Zellen wie bei der Adhärenzbestimmung (s. 2.4.4) in 1 ml PBS + Triton resuspendiert und dann je 100 µl Suspension, hier unverdünnt, auf Winkle-Agar-Platten ausgespatelt. Nach Inkubation und Zählung ergab die Zahl der Kolonien mit 10 multipliziert die Zahl der cfu/ml.

Zeigte sich in den vorherigen Experimenten ein Ansteigen der Kontrollwerte, wurde die Gentamicin-Konzentration bis auf maximal 300 µg/ml erhöht. Ein toxischer Effekt auf die Zellen war dabei nicht zu beobachten.

2.5 Internalisierung von beladenen Latexpartikeln

Verwendet wurden Latexpartikel (latex beads), die in einer ca. 10 %igen Suspension in Aqua dest. vorlagen. Der durchschnittliche Durchmesser der Partikel betrug 3,04 µm, die Standardabweichung 0,14 µm. Die Größe bewegte sich also in der Größenordnung von Bakterien.

2.5.1 Beladen der Latexpartikel

Die Latexpartikel wurden zum einen mit Elastase beladen, zum anderen als Nullkontrolle mit einem möglichst inerten Protein, um die reaktiven Gruppen an der Oberfläche der Partikel abzusättigen. Dazu diente Rinderserumalbumin (RSA), das in 30%iger Lösung zur Verfügung stand.

Zur Beladung mit Elastase wurde eine Lösung mit 90 µg Elastase/ml in PBS hergestellt (je 1 ml PBS + 18µl Elastase-Stammlösung I in Eppendorf-Hütchen). Dazu wur-

den je 10 µl Latexpartikel- Suspension pipettiert, gut vermischt und für zwei Stunden unter regelmäßigem Schütteln bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Latexpartikel abzentrifugiert (5 min bei 13 000 rpm), der Überstand verworfen, die pellets in jeweils 1 ml PBS resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Nach dreimaliger Wiederholung stand eine Lösung mit beladenen Latexpartikeln zur Verfügung, die lichtgeschützt bei 4°C lagerbar war.

Die Beladung mit RSA erfolgte in einer 1%igen Lösung in PBS (je 1 ml PBS + 33 µl RSA-Lösung in Eppendorf-Hütchen). Die Menge der zugegebenen Latexpartikel-Suspension, die Inkubationszeit und die weitere Behandlung entsprachen dem beschriebenen Ansatz zur Beladung mit Elastase.

2.5.2 Markierung mit FITC

Der zur Markierung notwendige Puffer wurde folgendermaßen hergestellt:

5 ml einer 50 mM Na₂CO₃-Lösung auf 45 ml Aqua dest. (resultierend 5 mM Na₂CO₃) + 100 mM NaCl in Lösung bringen und unter Zugabe von HCl 10 % bzw. NaOH 10 % auf pH 9,2 einstellen.

In je 1 ml dieses Puffers wurde jeweils 1 µg FITC gelöst. Dazu wurden jeweils 500 µl der beladenen Latexpartikel pipettiert und die Suspension dann für 30 min unter regelmäßigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Latexpartikel abzentrifugiert (5 min bei 13 000 rpm) und fünf Mal mit PBS gewaschen. Nach der Restituierung in 1 ml PBS standen die Latexpartikel zur Inkubation bereit.

2.5.3 Inkubation mit Zellen

Zur Inkubation wurden T24-Zellen wie oben beschrieben in 24-MTP angezogen. Zusätzlich dazu wurden in der MTP zwei Reihen mit kleinen sterilen Glasplättchen (cover slips) versehen und die Zellen auf diesen gezogen. Die weitere Behandlung der Zellen entsprach dem oben vorgestellten Procedere (s. 2.2.3).

Der Inkubationsansatz wurde analog zu den Bakterienansätzen (vgl. 2.4.2) in M199 unter Zugabe von 10 ng/ml EGF in einem Teil der Zellen angesetzt. Die Latexpartikel wurden 1:5 verdünnt und je 1 ml der Inkubationsansätze zu den Zellen pipettiert.

Nach der Inkubation (1 h bei 37°C, 5 % CO₂) wurden die Latexpartikel-Suspensionen abgenommen und die Wells fünf Mal mit PBS gespült. Eine Erhöhung der Spülungszahl brachte keinen merklichen Effekt. Die Zellen wurden mit 500 µl M199 gepuffert. Die cover slips wurden mit 2 %iger Paraformaldehyd-Lösung 20 min fixiert, danach drei Mal mit Aqua dest. gespült und aus der MTP herausgelöst. Mit der bewachsenen Seite nach unten auf Objekträger aufgebracht konnten sie unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden und waren im Kühlschrank in einer feuchten Kammer für einige Tage konservierbar.

Für die Auswertung der Internalisierung an Zellen war ein inverses Fluoreszenzmikroskop erforderlich. Bei beiden Präparationsarten bot die Zusammenschau von Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit, intrazellulär gelegene Latexpartikel von extrazellulär gelegenen zu unterscheiden. Die Anzahl der internalisierten Latexpartikel wurde ausgezählt und untereinander verglichen.

2.6 Isolierung der elastasespezifischen Antikörper mittels Immunpräzipitation

2.6.1 Verfahren

Bei den kommerziell erworbenen Anti-Elastase-Antikörpern handelt es sich, wie aus den angegebenen Isolierungsschritten in der Produktinformation ersichtlich ist, um die gesamte IgG-Fraktion eines Kaninchens. Da sich bei den ersten Vorversuchen herausstellte, daß auch gegen *E. coli* gerichtete Antikörper im Antiserum vorlagen, mußten für eine spezifische Markierung der Elastase zuerst die Anti-Elastase-AK isoliert werden. Dieses geschah mit einer wie folgt durchgeführten Immunpräzipitation:

Elastasestammlösung I wurde auf eine Konzentration von 100 µg/ml in PBS verdünnt. Diese Lösung wurde mit kleinen Nitrozellulosestücken (NZZP-Stücken) aufgesaugt, welche anschließend an der Zimmerluft für 60 min getrocknet und dann für 30 min in PBS + 1 % Magermilch + 0,01 % Tween 20 (PBS-MaTw) geblockt und fünf Mal mit PBS + 0,01 % Tween 20 (PBS-Tw) gewaschen wurden.

200 µl des unverdünnten Antikörperserums wurden mit 300 µl PBS-Tw gemischt und die NZZP-Stücke darin für 2 h bei ZT unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die NZZP-Stücke fünf Mal mit PBS-Tw gewaschen.

Die Eluierung der gebundenen Antikörper erfolgte durch Inkubation für 15 min in 0,1 M Glycinlösung (auf pH 2,5 eingestellt). Die NZP-Stücke wurden danach verworfen. Die Glycinlösung wurde durch Zugabe von 1 M Trispuffer auf pH 7,3 eingestellt und durch Zugabe von 1 µg RSA/100 µl stabilisiert. Die Lagerung der AK-Lösung erfolgte portioniert in Eppendorf-Hütchen bei -18°C .

2.6.2 Kontrolle der isolierten Antikörper

Um sicherzustellen, dass die wie oben beschrieben hergestellte Lösung auch noch funktionierende Antikörper beinhaltet, wurden auf ein Stück NZP jeweils 10 µl Elastasestammlösung I und PBS getropft, die NZP an der Luft getrocknet, für 30 min in PBS-MaTw geblockt und zwei Mal in PBS-Tw gewaschen. Die Elastase-AK-Lösung wurde 1:100 in PBS-MaTw verdünnt und mit der NZP für 2 h bei ZT auf dem Schüttler inkubiert. Die weiteren Schritte zur Markierung und Anfärbung der gebundenen Antikörper entsprachen dem in 2.8.2 beschriebenen Verfahren. Das Ergebnis dieser Kontrollanfärbung findet sich in Kap. 3.2.

2.7 Markierung der gebundenen Elastase an der Bakterienoberfläche (indirekte Immunfluoreszenz)

Im ersten Schritt wurden die Bakterien wie oben beschrieben mit Elastase inkubiert (getrennte Versuche mit zwei verschiedenen Aktivitäten: $A_{\text{Ela}} = 0,1$ und $1,0$ U/ml) (s. 2.3.3). Nach der Inkubation wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min bei 4000 rpm) und zwei Mal gewaschen (das erste Mal mit M199, das zweite Mal mit PBS).

Die Anti-Elastase-Antikörper wurden PBS verdünnt, wobei die Konzentrationen in unterschiedlichen Experimenten bei 1:50, 1:100 und 1:500 lagen. Je 100 µl davon wurden in die Eppendorf-Tubes pipettiert. Die vorinkubierten Bakterien wurden mit der Platinöse überimpft und mittels eines McFarland-Standards optisch auf eine Bakteriendichte von ca. 10^6 Bakterien/ml eingestellt (entspricht Stufe 3-4 des Standards). Die Bakterien wurden mit den Antikörpern für 60 min bei Zimmertemperatur inkubiert, danach abzentrifugiert (5 min bei 5000 rpm) und drei Mal mit PBS-Tw gewaschen.

Zur Markierung der Anti-Elastase-Antikörper wurden danach die Pellets mit FITC-markierten Anti-Kaninchen-Antikörpern von der Ziege (Verdünnung 1:50 in PBS) resuspendiert und für 45 min bei ZT inkubiert. Nach Abzentrifugation (5 min bei 5000 rpm) und erneutem Waschen (drei Mal mit PBS-Tw) und Resuspendierung in PBS

wurde ein Tropfen auf einem Objektträger ausgestrichen, mit einem Deckgläschen geschützt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.8 Dotblot

Der Dotblot ist ein Verfahren, um Bakterien, Proteine o.ä. auf Nitrozellulose aufzubringen, dort zu immobilisieren und dann mit Hilfe von Antikörpern zu markieren. Ebenso können fest gebundene Substanzen angefärbt werden. Verwendet wurden alle vier *E. coli*-Stämme. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden sie auf Loeb- Agar mit CaCl_2 überimpft und wie oben beschrieben angezogen (s. 2.1.2).

2.8.1 Aufbringen der Bakterien auf Nitrozelluloseplatten

Die Bakterien wurden wie oben beschrieben mit Elastase inkubiert (s. 2.3.2), die Aktivität lag bei 0,5 U/ml. Nach zweimaligem Waschen standen sie zur Einstellung zur Verfügung. Dafür wurden sowohl mit unbehandelten als auch mit behandelten *E. coli* Bakteriensuspensionen in PBS auf McFarland 4 eingestellt (vgl. 2.7). Danach wurden die Suspensionen vier Mal jeweils im Verhältnis 1:2 in PBS verdünnt, sodass die Verdünnungen 1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 resultierten.

In eigens für die Aufbringung auf Nitrozellulose gefertigten Kammern wurde erst eine Lage von in Aqua dest. getränkten Filterpapier und dann eine ebenfalls getränkte Lage Nitrozellulose gelegt. Darauf wurde der Deckel geschraubt, in die dafür vorgesehenen Wells je Probe 200 μl pipettiert und diese dann durch Anlegen eines Unterdrucks mittels Saugpumpe auf die Nitrozellulose gezogen. Die beladenen Nitrozelluloseblätter wurden über Nacht an der Luft getrocknet und waren dann lichtgeschützt bei Zimmertemperatur für längere Zeit lagerbar.

2.8.2 Anfärben gebundener Antikörper mittels POD-Reaktion

Zuerst wurden die Plättchen durch Inkubation mit PBS-MaTw abgesättigt (Inkubation für 30 min bei ZT auf dem Schüttler) und 2 Mal mit PBS-Tw gewaschen. Dann wurde die Waschlösung abgeschüttet und die Inkubation mit den ersten Antikörpern vorgenommen: Anti-Elastase-Ak in 5 ml PBS-Tw, Inkubation für 2 h unter regelmäßigem Schütteln bei ZT. Die verwendeten Ak-Konzentrationen lagen in mehreren unterschiedlichen Versuchen bei 1:75, 1:100 und 1:250.

Dann wurde die Antikörperlösung verworfen und die Plättchen drei Mal für je 10 min mit PBS-Tw gewaschen. Zur Markierung der gebundenen Anti-Elastase-Ak wurden Anti-Kaninchen-Ak von der Ziege, mit POD beladen, im Verhältnis 1:1000 in 5 ml PBS-Tw gelöst und dann für 1,5 h unter regelmäßigem Schütteln bei ZT mit den Plättchen inkubiert. Die gewählte Ak-Konzentration hatte sich in den Vorversuchen als diejenige herausgestellt, die eine gute Anfärbung der Positivkontrolle bei sicher negativer Konjugatkontrolle ergab.

Am Ende der Inkubation wurde die Antikörperlösung wiederum verworfen und die Plättchen erst für 5 min in PBS-Tw und dann drei Mal für je 10 min in 0,1 N Natrium-Acetat-Lösung gewaschen.

Zur Färbung der POD- markierten Antikörper wurden folgende Lösungen benötigt:

- **Färbelösung:**

10 ml 0,1 N Natrium-Acetat + 5 µl 30%iges H_2O_2 + 100 µl Farbreagenz (s. 2.4.1).

- **Stopplösung:**

50 mg Natrium-Thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) auf 10 ml Aqua dest.

Zuerst wurde die Färbelösung auf die Plättchen gegeben und im Dunkeln für wenige Minuten inkubiert. Beim Erscheinen einer ausreichenden Farbreaktion nach 2-4 min wurde die Färbelösung abgegossen und die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung innerhalb von 5 min geblockt. Nach anschließender Trocknung an der Luft wurden die Platten ausgewertet und archiviert.

2.9 Messung der proteolytischen Aktivität

2.9.1 Messprinzip

Als Substrat diente Azocasein, da es ein unspezifisches und leicht zugängliches Substrat einer Vielzahl von proteolytischen Enzymen darstellt und auch von Elastase mit einer hohen Affinität hydrolysiert wird (Wiederanders et al. 1986). Dabei werden die farbstofftragenden Seitengruppen des Azocaseins abgespalten; diese verbleiben nach dem Ausfällen der höhermolekularen Proteinbestandteile in der Lösung. Die Messung der Extinktion erlaubt dann über den Vergleich mit mitgeführten Standards eine semiquantitative Bestimmung der enzymatischen Aktivität in der Probenlösung. Aufgrund der notwendigen Fällung der Proteine handelt es sich um eine Endpunktmessung. Um dennoch die Dynamik der enzymatischen Aktivität zu erfassen, wurden aus dem Inkubationsansatz zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und so der zeitliche Verlauf erfasst (zur genauen Evaluierung des Verfahrens s. Langner et al. 1973, Wiederanders et al. 1986).

2.9.2 Herstellung des Substrats

Das Azocasein lag als Lyophilisat vor und wurde entsprechend den Vorschriften des Herstellers im Verhältnis 1:50 im Wasserbad bei 37°C in PBS gelöst. Die resultierende 2%ige Lösung wurde bis zur Verwendung bei –18°C aufbewahrt.

2.9.3 Messvorgang

Die Bakterien aller vier Stämme wurden wie unter 2.3.2 beschrieben mit M199 + Elastase ($A_{\text{Ela}} = 0,1 \text{ U/ml}$) behandelt. Zusätzlich zum ersten Spülen wurden dieses Mal die Bakterien noch ein zweites Mal mit PBS gewaschen und dann auch in PBS resuspendiert. Die Einstellung der Suspensionen mit unbehandelten und behandelten Bakterien erfolgte wie oben beschrieben auf eine Extinktion von 0,1 bei $\lambda = 640 \text{ nm}$.

Zu Versuchsbeginn wurden jeweils 2 ml der Proben mit je 2 ml 2%igem Azocasein gemischt. Sofort nach dem Mischen wurde die ersten Portionen als Ausgangswerte (je 900 μl) entnommen. Dann wurden die Proben bei 37°C im Schüttelschrank inkubiert. Nach 45 min und 90 min erfolgten die weiteren Portionsentnahmen. Als Standards wurden PBS-Proben mit definierter Elastaseaktivität (0,05 U/ml, 0,1 U/ml und 0,5 u/ml) und als Nullkontrolle eine reine PBS-Probe mitgeführt.

Die entnommenen Portionen wurden mit je 900 μl 10%iger Trichloressigsäure (TCE) gemischt und offen für 10 min bei ZT inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation (10 min bei 10.000 rpm). Die Überstände wurden abgenommen und die Extinktion bei $\lambda = 336 \text{ nm}$ im Photometer gemessen. Als Eichleerwert diente ein Gemisch von 900 μl PBS und 900 μl 10% TCE.

2.9.4 Nullkontrolle

Um auszuschließen, dass sich die Extinktion der Lösung durch eine Metabolisierung oder Aufnahme der chromophoren Spaltprodukte durch die vitalen Bakterien in den Reaktionsansätzen ändert und die Ergebnisse dadurch verfälscht werden, wurde zu Beginn der Versuchsreihe eine Nullkontrolle durchgeführt. Dafür wurden zwei Bakteriensuspensionen (*E. coli* 2052 in PBS) hergestellt. Eine Suspension wurde direkt auf die Extinktion 0.1 bei $\lambda = 640 \text{ nm}$ eingestellt, die andere wurde vor der Einstellung über einer Gasflamme mehrfach bis zum Sieden erhitzt und damit die Bakterien abgetötet. Die Vitalität der Bakterien in den beiden Suspensionen wurde durch Ausspalteln von je 100 μl unverdünnter Suspension auf Winkle-Agar mit nachfolgender Bebrütung (24 h, 37°C) kontrolliert. Dabei erwies sich die Suspension mit den abgetöteten Bakterien tatsächlich als steril, während auf der Platte mit den vitalen Bakterien ein geschlossener Bakterienrasen wuchs.

Bei den ersten Vorversuchen war Überstand mit reichlich chromophoren Spaltprodukten asserviert worden. Dieser wurde nun durch Zugabe von HCl 10% bzw. NaOH 10% auf pH 7,5 eingestellt. Jeweils 1,5 ml des Überstandes wurden mit je 1,5 ml der Bakteriensuspensionen vermischt und über 90 min der Verlauf der Extinktion bei $\lambda = 336 \text{ nm}$ gemessen. Zwischen den einzelnen Meßpunkten wurden die Proben bei 37°C inkubiert. Dabei kam es zu keiner Änderung der Extinktion; die detaillierten Ergebnisse finden sich in Kap. 3.6.

2.10 Auswertung und statistisches Vorgehen

2.10.1 Adhärenz- und Internalisierungsversuche

Die Kolonien wurden wie beschrieben gezählt. Auffällig ist beim Betrachten der Daten die hohe interexperimentelle Variabilität der Werte. Daher wurde zur besseren Standardisierung folgendes Verfahren angewandt: Aus den pro Versuch erhaltenen

zwei Werten für die Nullkontrolle (NK1 und NK2) wurde das arithmetische Mittel gebildet. Dieses diente nach folgender Formel als Divisor für die anderen Werte:

$$\text{errechneter Wert} = \frac{\text{Meßwert}}{\frac{\text{NK1} + \text{NK2}}{2}}$$

Diese errechneten Werte, im folgenden relative Adhärenzen bzw. relative Internalisierungen genannt, stellen also die jeweiligen Faktoren dar, durch die die Steigerungen durch Zugabe von Elastase und/oder EGF gegenüber der Nullkontrolle beschrieben werden können. Die Streuung der Werte wird durch diese Maßnahme tatsächlich deutlich verkleinert, die Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente innerhalb einer Messreihe ist wesentlich besser möglich.

Die mitgeführten Kontrollen des Spülwassers (vgl. 2.4.5) wurden nach folgenden Kriterien bewertet: Bei ≤ 10 cfu auf 100 μl galt die Kontrolle als unbedenklich, die Werte der entsprechenden items wurden mit in die Auswertung aufgenommen. Bei 11-15 cfu wurden die Werte der items einer kritischen inhaltlichen Betrachtung unterworfen; beim Vorliegen von Ausreißern oder sehr hohen cfu-Werten wurde das Experiment von der Auswertung ausgeschlossen. Werte über 15 cfu führten regelmäßig zum Ausschluß aus der Auswertung. Eine Ausnahme hiervon bildet die Meßreihe 2332 - Bakterien mit Elastase behandelt (s. 3.1.1). Dort lagen die Kontrollwerte für die unbehandelten Bakterien des öfteren über der kritischen Grenze, für die behandelten Bakterien aber nicht. Dennoch sind die cfu-Werte bei den behandelten Bakterien signifikant gegenüber den unbehandelten erhöht. Die Ergebnisse wurden daher in die Auswertung aufgenommen, wobei zu mutmaßen ist, dass die Unterschiede bei besser ausfallenden Kontrollen noch deutlicher gewesen wären.

Die ausgezählten Werte wurden mit Excel 2000 (Microsoft Corp.) erfasst, und aus den Ergebnissen der jeweiligen Gruppen wurden im Rahmen der deskriptiven Statistik folgende Werte berechnet: arithmetisches Mittel (Mittelwert, MW), Median (Med), Standardabweichung (standard deviation, SD) sowie die 25- und 75- Quartile. Da die Werte wegen der allgemein großen Streuungen und der relativ kleinen Stichprobenumfänge sehr wahrscheinlich als nicht normalverteilt gelten müssen, müssen die Angaben für Mittelwerte und Standardabweichungen mit großer Zurückhaltung betrachtet werden. Sie sind allein der Vollständigkeit halber angegeben. Die grafischen Darstellungen in den Box-and-whiskers-plots beziehen sich auf die Mediane und Quartile.

Zur weiteren Analyse der Daten wurde eine Teststatistik herangezogen, um die Ergebnisse auf ihre Aussagefähigkeit, d.h. Signifikanz hin zu untersuchen. Aus den oben dargelegten Gründen kann keine Normalverteilung angenommen werden; inhaltliche Überlegung lassen die Stichproben als unverbunden erscheinen. Daraus ergibt sich als geeigneter statistischer Test der U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney (MWM), hier in der exakten, zweiseitigen Testvariante angewandt. Dieser untersucht Unterschiede zwischen zwei nicht normalverteilten, unverbundenen Stichproben und ist auch bei relativ kleinen Fallzahlen und auf die errechneten relativen Adhärenzen bzw. Internalisierungen anwendbar. Die Teststatistiken wurden mit der Software SPSS Version 10.07 (SPSS Inc.) durchgeführt.

2.10.2 Antikörpermarkierungen

Die direkte Antikörpermarkierung an den lebenden Bakterien konnte nur visuell ausgewertet werden, da die Fluoreszenzen zu schwach für eine fotografische Dokumentation waren. Die Dotblots wurden archiviert, gescannt und visuell ausgewertet.

2.10.3 Internalisierung von Latexpartikeln

Diese konnte wegen der schwachen Fluoreszenz ebenfalls nur visuell erfasst werden. Wegen der insgesamt sehr geringen Zahl von internalisierten Partikeln in beiden untersuchten Gruppen wurde keine weitere Auswertung durchgeführt.

2.10.4 Proteolytische Aktivität

Aus den Messwerten der Extinktion wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Standards wurden als Eichgrundlage in die Diagramme eingetragen, die Messwerte für die Bakterien können im Vergleich dazu interpretiert werden. Da sich nach 90 min Inkubation die Standardabweichungen der Standards nicht überlappen, wurden die Unterschiede als signifikant betrachtet und kein statistischer Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Adhärenz und Internalisierung an T24-Zellen

3.1.1 *Escherichia coli* mit Elastase behandelt

Die Behandlung der Bakterien mit Elastase ($A_{\text{Ela}} = 0,1 \text{ U/ml}$) führte zu einer Erhöhung der Adhärenz an den untersuchten T24-Zellen um den Faktor 1,2-1,4 bei Abwesenheit und 1,4-2,6 bei Anwesenheit von EGF. Dabei war dieser Effekt von größerer Bedeutung als die Adhärenzsteigerung durch EGF (Faktor 1-1,3).

Die Internalisierung hingegen war deutlich von der Anwesenheit des EGF und dessen Konzentration beeinflusst. Wie bereits in früher durchgeführten Versuchen gezeigt (Straube et al. 2000), ist die Steigerung der Internalisierung am stärksten bei EGF-Konzentrationen von 10 ng/ml (s. *E. coli* 2052 und 2332). Die Konzentration von 20 ng/ml zeigt offensichtlich einen abnehmenden fördernden Effekt. Bei der Konzentration von 2 ng/ml ist zwar die Zahl der internalisierten Bakterien geringer als bei 20 ng/ml, die Steigerung der Internalisierung durch Vorbehandlung der Bakterien mit Elastase ist aber ausgeprägter als bei 20 ng/ml: Faktor 1,94 vs. 1,68 bei *E. coli* 2980 bzw. Faktor 1,92 vs. 1,55 bei *E. coli* 2313.

In den Vorversuchen hatte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Steigerungen von Adhärenz- und Internalisierungswerten bei EGF-Konzentrationen von 2 und 10 ng/ml gezeigt. Eigentlich wäre die Messung von Adhärenz und Internalisierung bei allen drei Konzentrationen (2, 10 und 20 ng/ml) für alle vier Bakterienstämme nötig gewesen; der besseren Übersicht halber wurde darauf verzichtet und die Messungen bei der Konzentration von 2 ng/ml für *E. coli* 2313 und 2980, der Konzentration von 10 ng/ml für *E. coli* 2052 und 2332 und der Konzentration von 20 ng/ml für allen vier Stämmen durchgeführt.

Im genannten unteren und mittleren Konzentrationsbereich von EGF führt die Vorbehandlung mit Elastase bei allen vier Bakterienstämmen zu einer signifikanten Erhöhung der Internalisierung (um den Faktor 1,4-1,94 gegenüber den unbehandelten Bakterien). Bei einer EGF-Konzentration von 20 ng/ml war nur bei *E. coli* 2980 eine signifikante Steigerung zu messen. Bei Abwesenheit von EGF ergab sich keine Veränderung der Internalisierung.

Die Tabellen 3.1-3.8 zeigen die Mediane, Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und das Signifikanzniveau (p) im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Als signifikant galten Ergebnisse mit $p < 0,05$. Diese sind in den Tabellen fett gedruckt und mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Da die Werte als nicht normalverteilt angesehen werden müssen (vgl. 2.10.1), bezieht sich die Argumentation auf die Mediane. Die Mittelwerte und Standardabweichungen werden lediglich der Vollständigkeit halber aufgeführt. Neben den absoluten Messwerten sind die Verhältnisse in Relation zur Nullkontrolle berechnet (zum Verfahren und zur inhaltlichen Diskussion vgl. 2.10.1). Dabei zeigte sich, dass die Betrachtung der Verhältnisse ein wesentlich genaueres Bild der Adhärenz und Internalisierung liefert. Im folgenden getroffene Aussagen zu Signifikanzen beziehen sich daher auf die errechneten Verhältnisse.

Die Abbildungen 3.1-3.4 zeigen die grafische Darstellung der Ergebnisse. Die Messreihen ohne Elastase sind weiß, die Messreihen mit Elastase grau gezeichnet. Neben den Medianen sind die 25- und 75-Quartile (Q_{25} und Q_{75}) in den Boxen und die Minimal- und Maximalwerte als Klammern in den Box-and-whiskers-Plots aufgetragen.

a) *E. coli* 2052 - Bakterien vorbehandelt

Adhärenz		Null-kontrolle	Elastase	EGF 10ng/ml	Elastase + EGF 10ng/ml	EGF 20ng/ml	Elastase + EGF 20ng/ml
cfu / ml (x1000)	Med	63,0	81,0	83,5	102,0	67,5	113,0
	MW	70,4	88,0	76,1	112,5	71,9	106,0
	SD	35,68	41,03	39,17	48,17	32,6	42,91
	p	0,280		0,089		0,052	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,2	1,01	1,57	1,15	1,43
	MW	1,0	1,35	1,09	1,68	1,08	1,68
	SD	0,17	0,51	0,26	0,39	0,23	0,76
	p	0,029*		0,015*		0,007*	

Tab. 3.1: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2052 an T24-Zellen. n = 10.

Internalisierung		Null-kontrolle	Elastase	EGF 10ng/ml	Elastase + EGF 10ng/ml	EGF 20ng/ml	Elastase + EGF 20ng/ml
cfu / ml (x10)	Med	33,5	40,5	256,0	459,5	238,5	379,5
	MW	40,8	54,6	317,1	527,6	273,5	334,3
	SD	21,68	35,23	166,76	267,74	147,11	158,91
	p	0,353		0,029*		0,393	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,51	8,71	14,50	6,67	7,92
	MW	1,0	1,40	8,47	14,32	6,78	8,80
	SD	0,11	0,46	2,63	6,49	1,77	3,42
	p	0,063		0,035*		0,190	

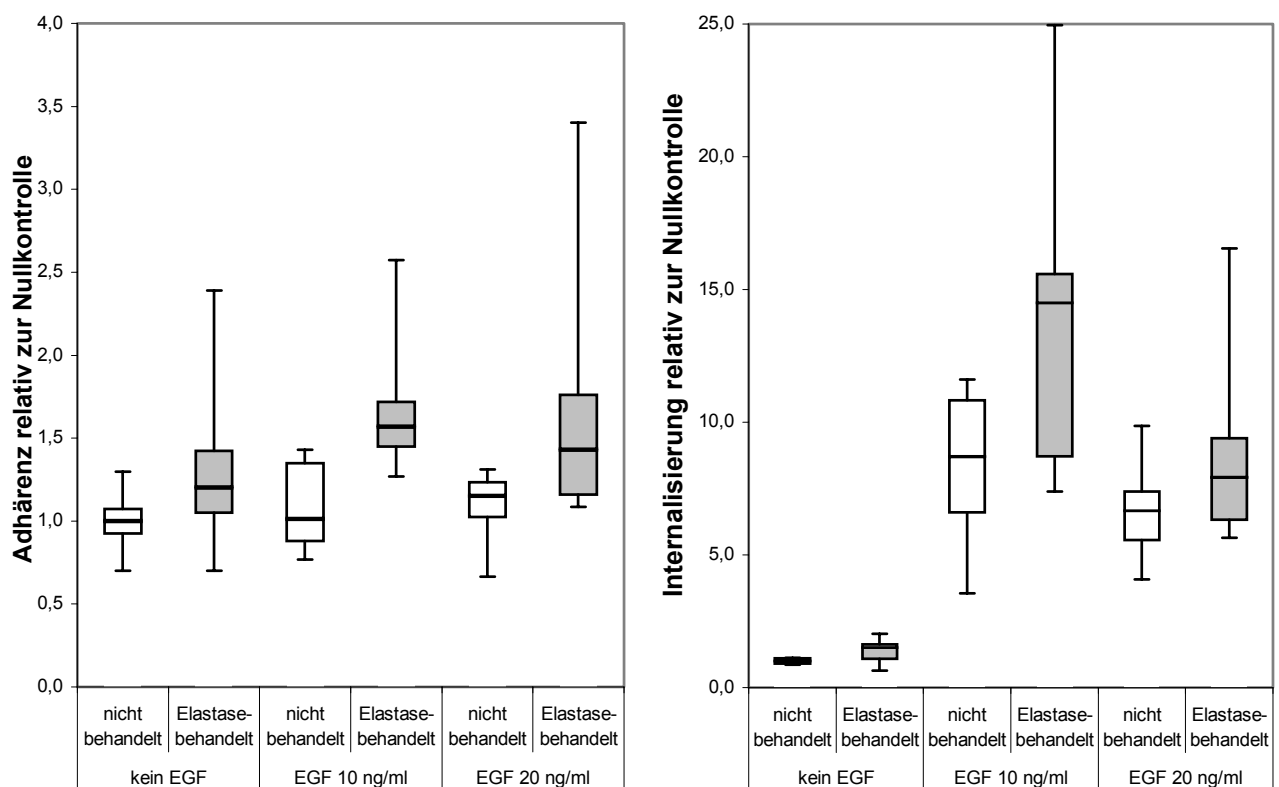
Tab. 3.2: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2052 in T24-Zellen. n = 10.

Abb. 3.1: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von 2052 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. n = 10.

b) *E. coli* 2332 - Bakterien vorbehandelt

Adhärenz		Null-kontrolle	Elastase	EGF 10ng/ml	Elastase + EGF 10ng/ml	EGF 20ng/ml	Elastase + EGF 20ng/ml
cfu / ml (x1000)	Med	57,0	66,0	58,0	90,0	46,0	82,5
	MW	65,7	78,8	75,1	94,5	46,0	82,5
	SD	40,43	47,42	37,05	42,22	42,52	34,13
	p	0,481		0,165		0,579	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,23	1,11	1,44	0,91	1,51
	MW	1,0	1,25	1,28	1,62	1,04	1,55
	SD	0,14	0,29	0,51	0,49	0,26	0,56
	p	0,019*		0,052		0,019*	

Tab. 3.3: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2332 an T24-Zellen. n = 10.

Internalisierung		Null-kontrolle	Elastase	EGF 10ng/ml	Elastase + EGF 10ng/ml	EGF 20ng/ml	Elastase + EGF 20ng/ml
cfu / ml (x10)	Med	86,5	105,0	432,5	560,0	378,0	395,5
	MW	94,7	106,3	465,2	629,6	378,2	433,5
	SD	44,58	48,01	199,48	275,22	177,22	210,60
	p	0,315		0,143		0,691	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,11	5,0	6,82	4,31	4,84
	MW	1,0	1,14	5,18	6,90	4,22	4,65
	SD	0,12	0,40	1,37	1,38	1,33	0,80
	p	0,481		0,009*		0,529	

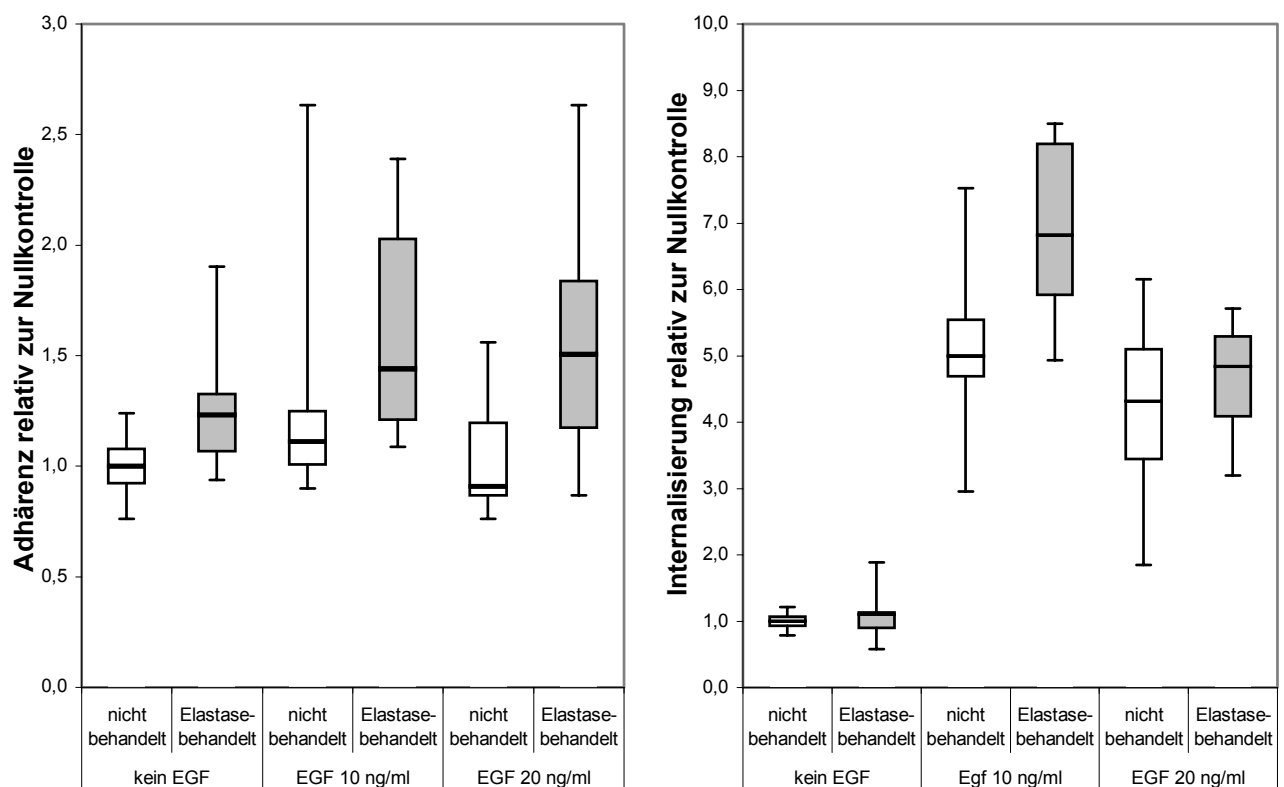
Tab. 3.4: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2332 in T24-Zellen. n = 10.

Abb. 3.2: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von 2332 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. n = 10.

c) *E. coli* 2980 - Bakterien vorbehandelt

Adhärenz		Null-kontrolle	Elastase	EGF 2ng/ml	Elastase + EGF 2ng/ml	EGF 20ng/ml	Elastase + EGF 20ng/ml
cfu / ml (x1000)	Med	240,5	286,0	215,0	302,5	235,5	321,0
	MW	259,14	357,07	267,86	389,93	287,36	387,93
	SD	124,81	197,72	133,08	240,92	136,76	261,11
	p	0,150		0,306		0,085	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,43	1,11	1,42	1,28	1,48
	MW	1,0	1,38	1,09	1,57	1,17	1,52
	SD	0,11	0,36	0,33	0,66	0,34	0,56
	p	0,001*		0,069		0,104	

Tab. 3.5: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2980 an T24-Zellen. n = 14.

Internalisierung		Null-kontrolle	Elastase	EGF 2ng/ml	Elastase + EGF 2ng/ml	EGF 20ng/ml	Elastase + EGF 20ng/ml
cfu / ml (x10)	Med	64,5	73,5	103,5	151,0	113,0	200,0
	MW	96,86	87,21	146,0	244,07	211,86	336,57
	SD	88,82	78,74	119,34	184,30	189,79	265,72
	p	0,454		0,104		0,062	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	0,94	1,42	2,75	2,31	3,89
	MW	1,0	0,93	1,85	2,96	2,36	3,83
	SD	0,19	0,42	1,16	1,14	0,95	1,14
	p	0,571		0,008*		0,002*	

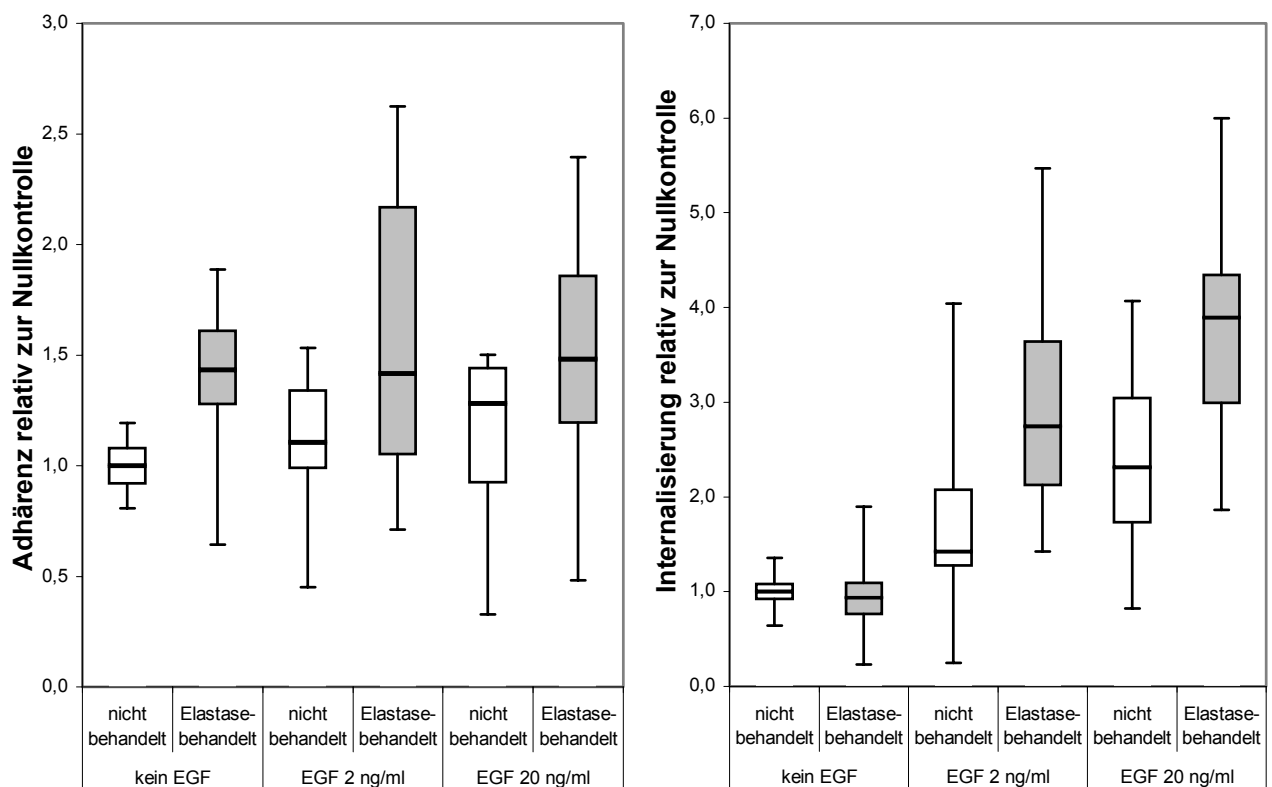
Tab. 3.6: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2980 in T24-Zellen. n = 14.

Abb. 3.3: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von 2980 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. n = 14.

d) *E. coli* 2313 - Bakterien vorbehandelt

Adhärenz		Null-kontrolle	Elastase	EGF 2ng/ml	Elastase + EGF 2ng/ml	EGF 20ng/ml	Elastase + EGF 20ng/ml
cfu / ml (x1000)	Med	96,5	240,0	141,0	268,0	140,5	248,5
	MW	137,93	268,29	189,86	289,29	184,43	275,0
	SD	77,79	142,09	140,57	128,26	116,54	91,83
	p	0,002*		0,007*		0,002*	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	2,58	1,27	2,28	1,28	2,55
	MW	1,0	2,23	1,39	2,46	1,39	2,35
	SD	0,08	0,95	0,55	1,28	0,50	0,93
	p	0,021*		0,005*		0,005*	

Tab. 3.7: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2313 an T24-Zellen. n = 14.

Internalisierung		Null-kontrolle	Elastase	EGF 2ng/ml	Elastase + EGF 2ng/ml	EGF 20ng/ml	Elastase + EGF 20ng/ml
cfu / ml (x10)	Med	46,5	49,0	59,0	84,5	101,0	127,5
	MW	58,86	60,0	69,5	125,29	150,64	184,14
	SD	47,84	49,22	52,04	98,64	141,96	157,69
	p	0,946		0,114		0,401	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,17	1,45	2,78	2,54	3,93
	MW	1,0	1,12	1,33	2,67	2,57	3,34
	SD	0,24	0,62	0,57	1,34	1,11	1,37
	p	0,482		0,021*		0,062	

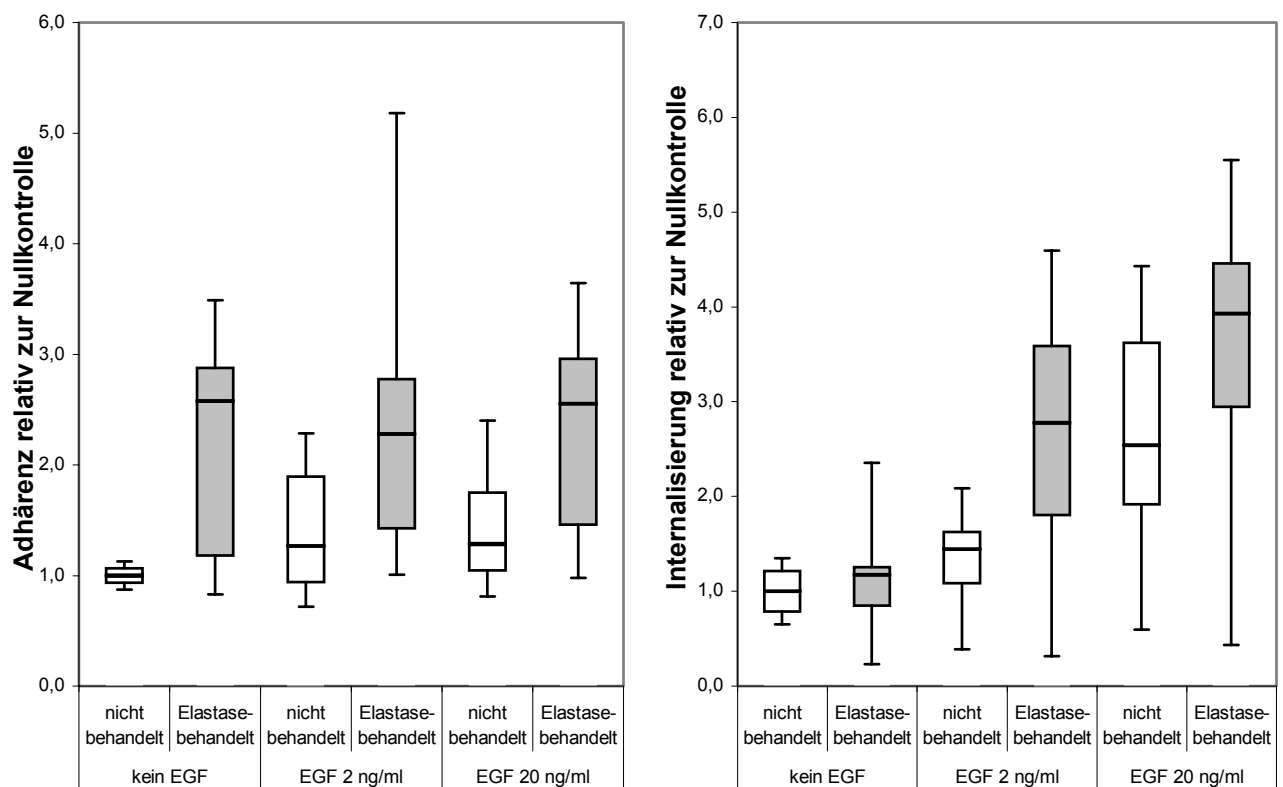
Tab. 3.8: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2980 in T24-Zellen. n = 14.

Abb. 3.4: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von 2313 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. n = 14.

3.1.2 Elastasevorbehandlung der Zellen

Zur Behandlung der T24-Zellen mit Elastase vor der Infektion musste, wie bereits in 2.3.3 dargelegt, mit einer niedrigeren Aktivität als die Behandlung der Bakterien durchgeführt werden. Die gewählte Aktivität von 0,05 U/ml liegt ebenso wie die Aktivität von 0,1 U/ml im physiologischen Bereich (Sepper et al. 1995).

Die Vorbehandlung der T24-Zellen mit Elastase (30 min, $A_{\text{Ela}} = 0,05 \text{ U/ml}$) führte größtenteils zu lediglich marginalen Erhöhungen von Adhärenz und Internalisierung. Nur bei *E.coli* 2052 und 2313 ergaben sich in Abwesenheit von EGF hochsignifikante Steigerungen der Adhärenz. Die Aussagefähigkeit der Internalisierungsmessungen wird dadurch stark eingeschränkt, dass die im Zellüberstand vorhandene Elastase eine Lösung der Zelllage vom Boden der MTP katalysierte und dadurch bis zu 40 % der Zellen durch das Spülen verloren gingen. Da der Spülvorgang bei der Internalisierungsmessung wesentlich intensiver war als bei der Adhärenzmessung, war der Verlust an Zellen hier deutlich größer. Es wurde versucht, diesem Umstand durch Senkung der A_{Ela} auf die Hälfte der eingesetzten Aktivität bei der Bakterienbehandlung Rechnung zu tragen; dadurch konnte der Zellverlust zwar verringert, aber nicht verhindert werden. Daher bleibt die Aussagekraft der Internalisierungsmessungen schwach und spekulativ. Der EGF-Effekt war in den Ansätzen ohne Elastase hingegen konstant reproduzierbar. Dieses spricht für die grundsätzliche Richtigkeit der Messungen.

Bei diesen Versuchen und den Versuchen mit Anwesenheit der Elastase im Infektionsansatz (s. 3.1.3) wurde EGF nur in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, da sich diese Konzentration in den Vorversuchen und bei den Ansätzen mit Vorbehandlung der Bakterien (s. 3.1.1) als die trennschärfste herausgestellt hatte.

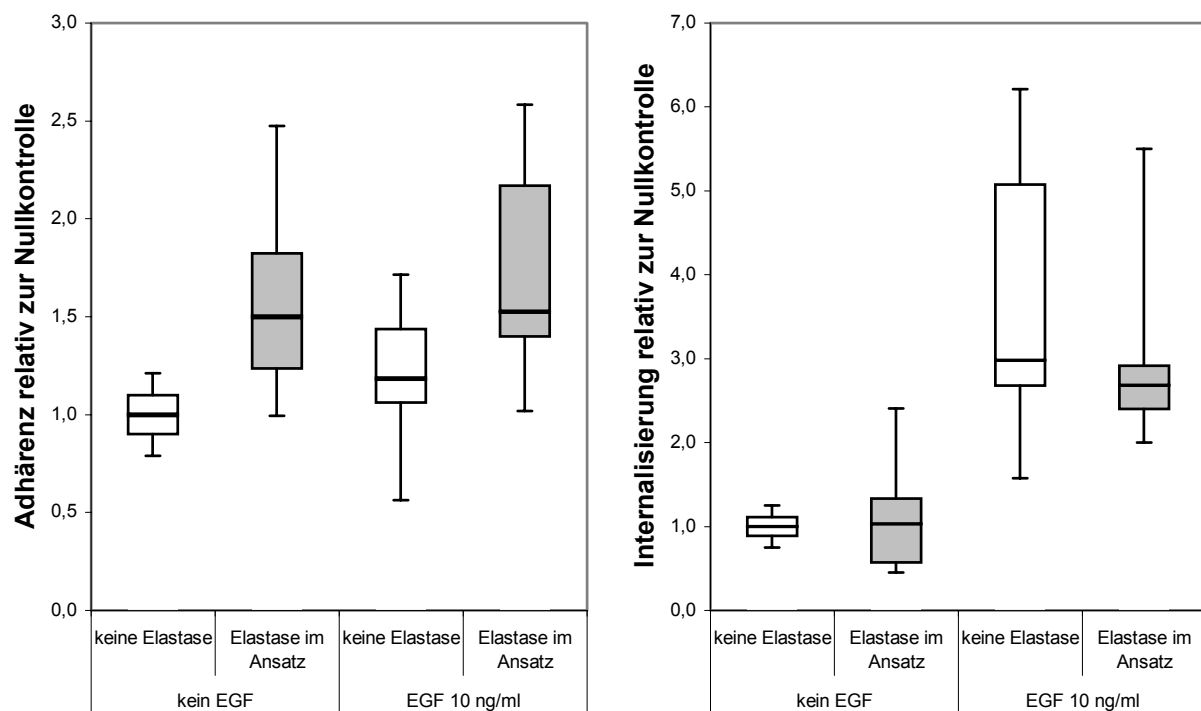
Die Ergebnisse sind analog zur Darstellung in 3.1.1 in den Tabellen 3.9-3.16 und in den Abbildungen 3.5-3-8 aufgeführt. Nicht-signifikante Ergebnisse sind dabei mit *n.s.* bezeichnet.

a) *E. coli* 2052 - Zellen vorbehandelt

Adhärenz		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert	keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert
cfu /ml (x1000)	Med	121,5	173,5	144,5	218,0
	MW	120,1	181,8	147,4	199,1
	SD	54,45	73,99	73,27	81,72
	p	0,063		0,19	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,50	1,18	1,53
	MW	1,0	1,59	1,22	1,77
	SD	0,13	0,47	0,33	0,58
	p	0,001*		0,089	

Tab. 3.9: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2052 an T24-Zellen. n = 10.

Internalisierung		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert	keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert
cfu /ml (x10)	Med	19,5	33,0	96,0	64,5
	MW	49,4	47,4	136,2	121,8
	SD	51,03	43,24	102,65	107,07
	p	n.s.		n.s.	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,03	2,98	2,68
	MW	1,0	1,09	3,7	2,93
	SD	0,16	0,61	1,64	1,02
	p	n.s.		n.s.	

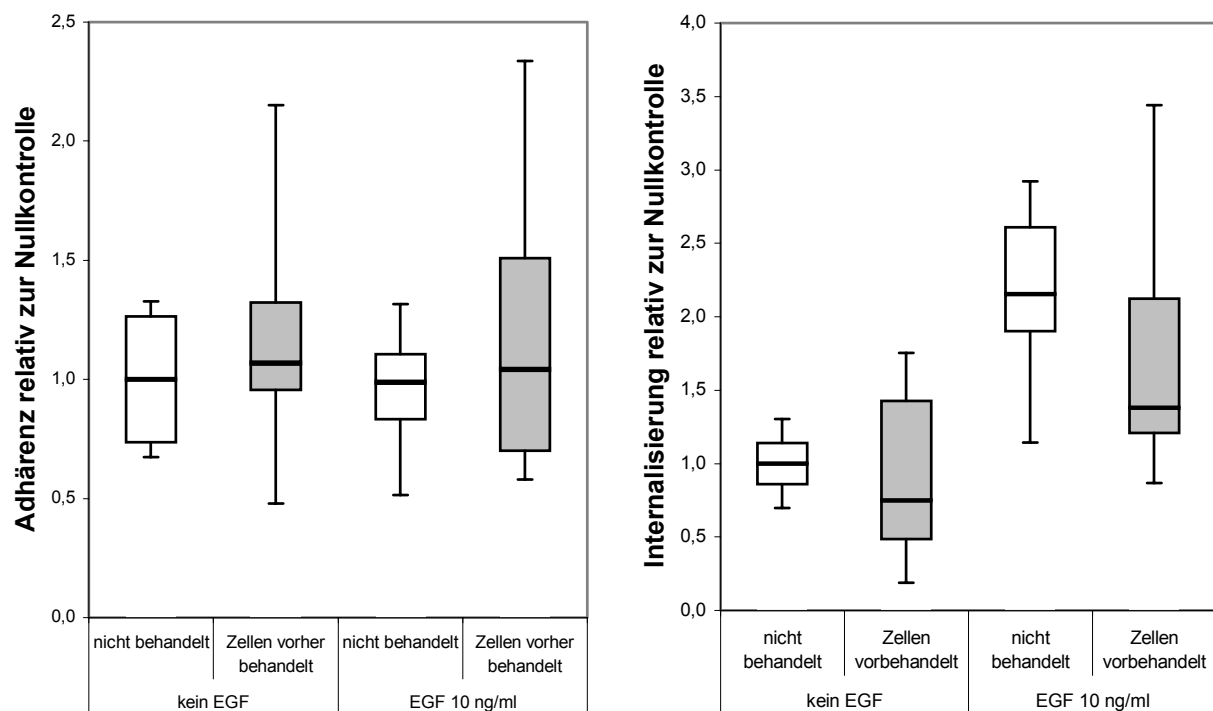
Tab. 3.10: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2052 in T24-Zellen. n = 10.Abb. 3.5: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von *E. coli* 2052 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. Die Zellen waren mit Elastase vorbehandelt ($A_{Ela} = 0,05$ U/ml). n = 10.

b) *E. coli* 2332 – Zellen vorbehandelt

Adhärenz		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert	keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert
cfu /ml (x1000)	Med	126,5	142,0	138,0	152,0
	MW	157,1	171,3	149,2	179,4
	SD	75,31	72,69	58,29	109,71
	p	0,436		0,971	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,07	0,99	1,04
	MW	1,0	1,16	0,97	1,16
	SD	0,27	0,44	0,25	0,57
	p	0,315		0,684	

Tab. 3.11: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2332 an T24-Zellen. n = 10.

Internalisierung		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert	keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert
cfu /ml (x10)	Med	38,0	28,5	101,0	47,5
	MW	59,8	70,3	132,4	124,8
	SD	49,07	76,80	95,84	118,71
	p	n.s.		n.s.	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	0,75	2,15	1,38
	MW	1,0	0,89	2,16	1,75
	SD	0,19	0,58	0,62	0,86
	p	n.s.		n.s.	

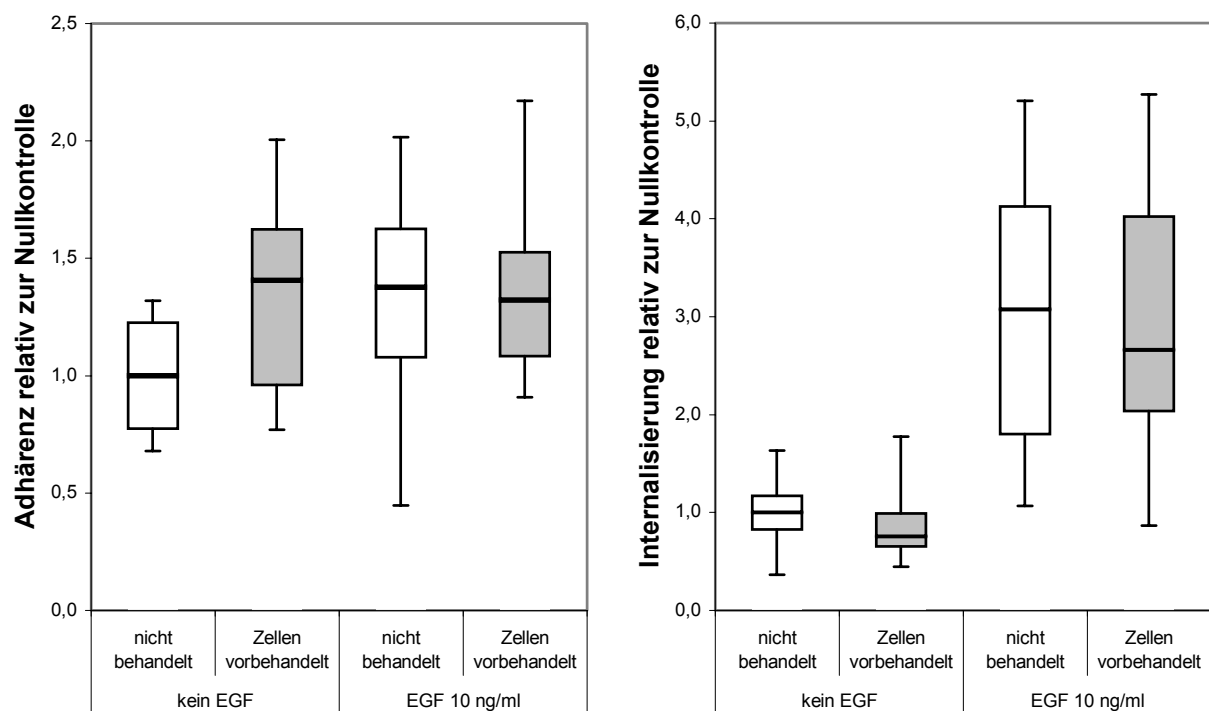
Tab. 3.12: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2332 in T24-Zellen. n = 10.Abb. 3.6: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von *E. coli* 2332 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. Die Zellen waren mit Elastase vorbehandelt ($A_{Ela} = 0,05$ U/ml). n = 10.

c) *E. coli* 2980 – Zellen vorbehandelt

Adhärenz		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert	keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert
cfu /ml (x1000)	Med	196,5	250,0	259,5	221,5
	MW	186,8	249,0	243,5	254,4
	SD	55,79	72,41	91,01	84,78
	p	0,052		0,971	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,41	1,38	1,32
	MW	1,0	1,36	1,31	1,36
	SD	0,25	0,45	0,47	0,39
	p	0,063		0,853	

Tab. 3.13: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2980 an T24-Zellen. n = 10.

Internalisierung		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert	keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert
cfu /ml (x10)	Med	63,5	62,7	211,0	157,0
	MW	88,7	58,0	194,1	183,1
	SD	72,69	42,6	112,23	125,8
	p	n.s.		n.s.	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	0,76	3,08	2,66
	MW	1,0	0,91	3,00	2,94
	SD	0,38	0,47	1,45	1,48
	p	n.s.		n.s.	

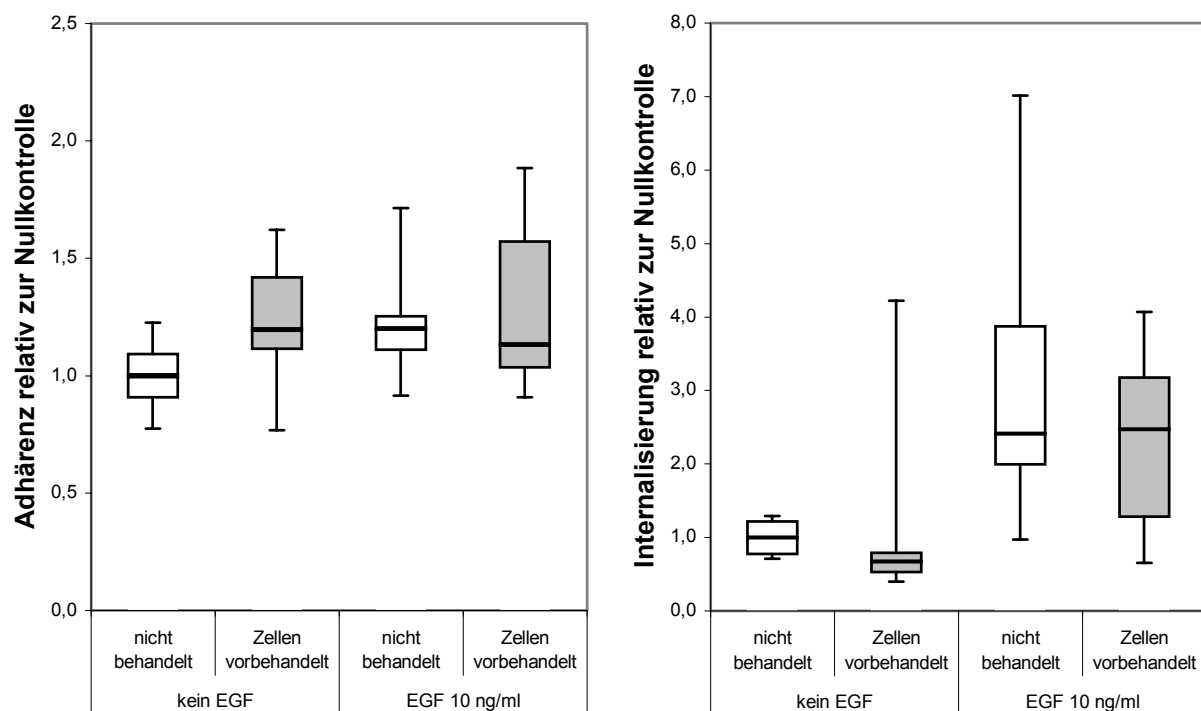
Tab. 3.14: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2980 in T24-Zellen. n = 10.Abb. 3.7: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von *E. coli* 2980 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. Die Zellen waren mit Elastase vorbehandelt ($A_{Ela} = 0,05$ U/ml). n=10.

d) *E. coli* 2313 – Zellen vorbehandelt

Adhärenz		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert	keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert
cfu /ml (x1000)	Med	165,0	195,0	207,0	190,5
	MW	186,8	229,8	228,8	244,6
	SD	87,39	108,11	105,89	151,58
	p	0,19		0.912	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,20	1,20	1,13
	MW	1,0	1,24	1,22	1,29
	SD	0,14	0,25	0,24	0,35
	p	0,015*		0.971	

Tab. 3.15: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2313 an T24-Zellen. n = 10.

Internalisierung		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert	keine Elastase	Zellen mit Elastase vorinkubiert
cfu /ml (x10)	Med	54,0	45,5	284,0	148,5
	MW	149,5	87,1	277,6	190,7
	SD	181,91	77,4	198,38	146,93
	p	n.s.		n.s.	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	0,68	2,41	2,47
	MW	1,0	1,08	3,19	2,29
	SD	0,23	1,17	2,05	1,22
	p	n.s.		n.s.	

Tab. 3.16: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2313 in T24-Zellen. n = 10.Abb. 3.8: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von *E. coli* 2313 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. Die Zellen waren mit Elastase vorbehandelt ($A_{Ela} = 0,05$ U/ml). n=10.

3.1.3 Elastasezugabe zum Infektionsansatz

Auch in diesem Versuchsansatz lag die verwendete Elastaseaktivität bei 0,05 U/ml, analog zum Vorgehen bei der Vorbehandlung der Zellen (s. 2.3.4 und 3.1.2).

Die Anwesenheit von Elastase im Infektionsansatz ($A_{\text{Ela}} = 0,05 \text{ U/ml}$) führte zu einer deutlichen Steigerung der Adhärenz um den Faktor 1,2-1,6 ohne Zugabe von EGF und um den Faktor 1,6-2,6 bei Zugabe von EGF (10 ng/ml). Die gemessenen Veränderungen waren in sechs von acht betrachteten Fällen signifikant.

Für die Internalisierung gelten auch hier die schon unter 3.1.2 ausgeführten Schwierigkeiten mit dem Zellverlust und den sich daraus ergebenden Verzerrungen der Internalisierungszahlen. So ergeben sich für *E. coli* 2052, 2980 und 2313 keine signifikanten Veränderungen. Bei *E. coli* 2332 läßt sich eine signifikante Steigerung der Internalisierung bei Zugabe von Elastase und EGF gegenüber der Nullkontrolle mit EGF zeigen ($p = 0,003$). Ob es sich hierbei tatsächlich um einen validen Effekt handelt, ist wegen der genannten Unsicherheiten nicht klar zu beurteilen.

Beim Betrachten der Internalisierungsmessungen zeigt sich, dass die Werte bei gleichzeitiger Anwesenheit von EGF und Elastase fast gleich hoch sind. Wenn dann berücksichtigt wird, dass von den Elastase-behandelten Zellen $\geq 40\%$ verloren gingen, könnte auch hier eine Internalisierungssteigerung durch Elastase vorliegen. Beweisen lässt sich diese Vermutung anhand der vorliegenden Ergebnisse gleichwohl nicht. Die inhaltliche Diskussion hinsichtlich einer möglichen Verbesserung des Infektionsansatzes findet sich in Kapitel 4.

Der Vergleich zwischen den Adhärenzwerten von „Elastasevorbehandlung der Zellen“ und „Elastasezugabe zum Infektionsansatz“ ergab nur bei gleichzeitiger Zugabe von EGF bei *E. coli* 2052 ($p = 0,019$) und 2980 ($p = 0,023$) signifikante Steigerungen. Die restlichen gemessenen Veränderungen waren gering und nicht signifikant.

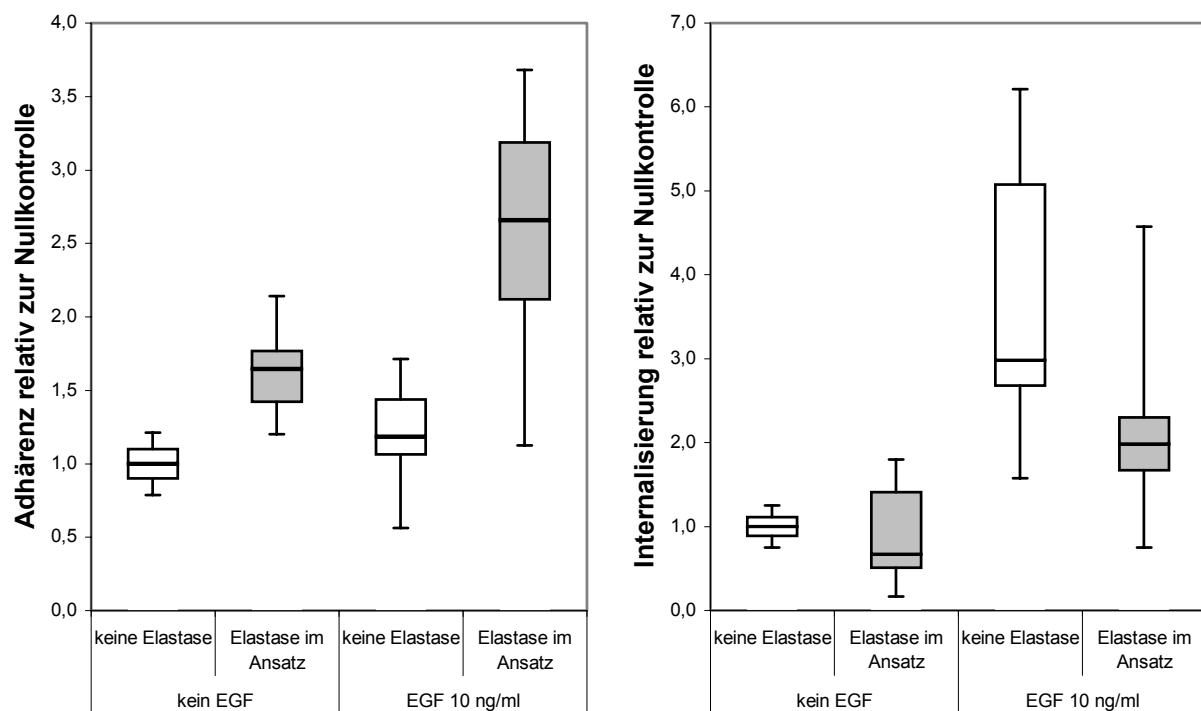
In den Tab. 3.17-3-24 sind die Ergebnisse analog zu 3.1.1 aufgeführt, Abb. 3.9-3.12 zeigen die Ergebnisse in grafischer Darstellung.

a) *E. coli* 2052 – Elastasezugabe zum Infektionsansatz

Adhärenz		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz	keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz
cfu /ml (x1000)	Med	121,5	163,0	144,5	328,5
	MW	120,1	201,1	147,4	296,7
	SD	54,45	113,77	73,27	122,49
	p	0.105		0.009*	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,65	1,18	2,66
	MW	1,0	1,63	1,22	2,62
	SD	0,13	0,29	0,33	0,84
	p	<0,001*		0,001*	

Tab. 3.17: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2052 an T24-Zellen. n = 10.

Internalisierung		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz	keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz
cfu /ml (x10)	Med	19,5	33,0	96,0	63,5
	MW	49,4	33,7	136,2	97,4
	SD	51,03	23,53	102,65	86,37
	p	n.s.		n.s.	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	0,67	2,98	1,98
	MW	1,0	0,92	3,7	2,33
	SD	0,16	0,57	1,64	1,25
	p	n.s.		n.s.	

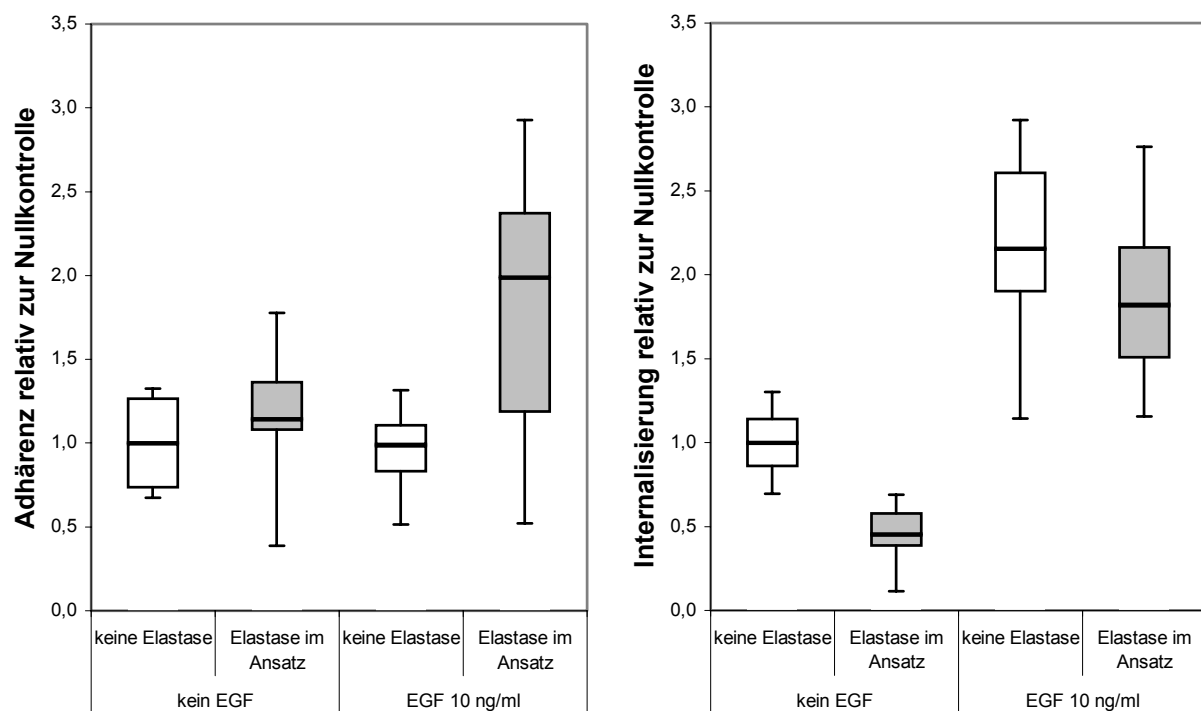
Tab. 3.18: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2052 in T24-Zellen. n = 10.Abb. 3.9: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von *E. coli* 2052 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. Im Infektionsansatz lag Elastase vor ($A_{Ela} = 0,05$ U/ml). n = 10.

b) *E. coli* 2332 – Elastasezugabe zum Infektionsansatz

Adhärenz		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz	keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz
cfu /ml (x1000)	Med	126,5	169,0	138,0	265,5
	MW	157,1	184,7	149,2	295,4
	SD	75,31	102,55	58,29	201,62
	p	0,481		0,023*	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,14	0,99	1,99
	MW	1,0	1,16	0,97	1,83
	SD	0,27	0,38	0,25	0,79
	p	0,315		0,011*	

Tab. 3.19: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2332 an T24-Zellen. n = 10.

Internalisierung		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz	keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz
cfu /ml (x10)	Med	38,0	15,0	101,0	83,0
	MW	59,8	32,0	132,4	106,8
	SD	49,07	30,0	95,84	72,15
	p	n.s.		n.s.	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	0,45	2,15	1,82
	MW	1,0	0,46	2,16	1,89
	SD	0,19	0,17	0,62	0,50
	p	n.s.		n.s.	

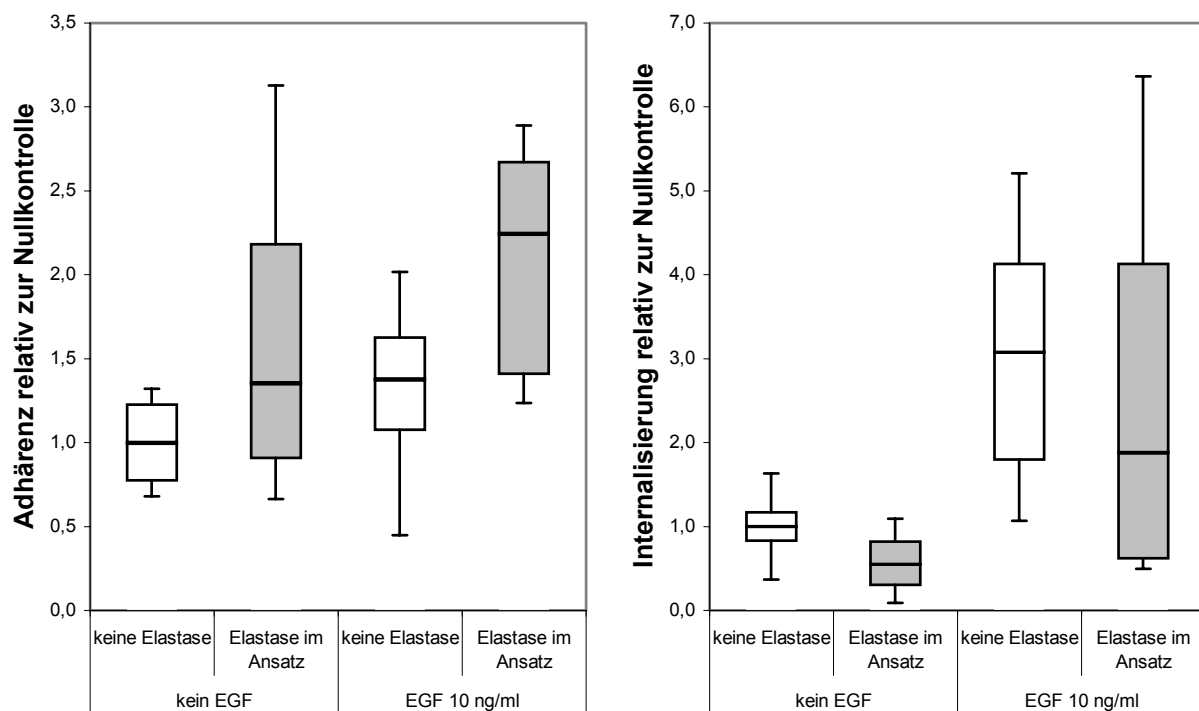
Tab. 3.20: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2332 in T24-Zellen. n = 10.Abb. 3.10: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von *E. coli* 2332 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. Im Infektionsansatz lag Elastase vor ($A_{Ela} = 0,05$ U/ml). n = 10.

c) *E. coli* 2980 – Elastasezugabe zum Infektionsansatz

Adhärenz		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz	keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz
cfu /ml (x1000)	Med	196,5	268,5	259,5	392,5
	MW	186,8	288,6	243,5	385,4
	SD	55,79	136,64	91,01	119,4
	p	0,123		0,009*	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,36	1,38	2,24
	MW	1,0	1,59	1,31	2,09
	SD	0,25	0,81	0,47	0,66
	p	0,089		0,019*	

Tab. 3.21: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2980 an T24-Zellen. n = 10.

Internalisierung		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz	keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz
cfu /ml (x10)	Med	63,5	47,5	211,0	108,0
	MW	88,7	40,4	194,1	107,3
	SD	72,69	23,78	112,23	39,96
	p	n.s.		n.s.	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	0,55	3,08	1,88
	MW	1,0	0,58	3,00	2,58
	SD	0,38	0,34	1,45	2,17
	p	n.s.		n.s.	

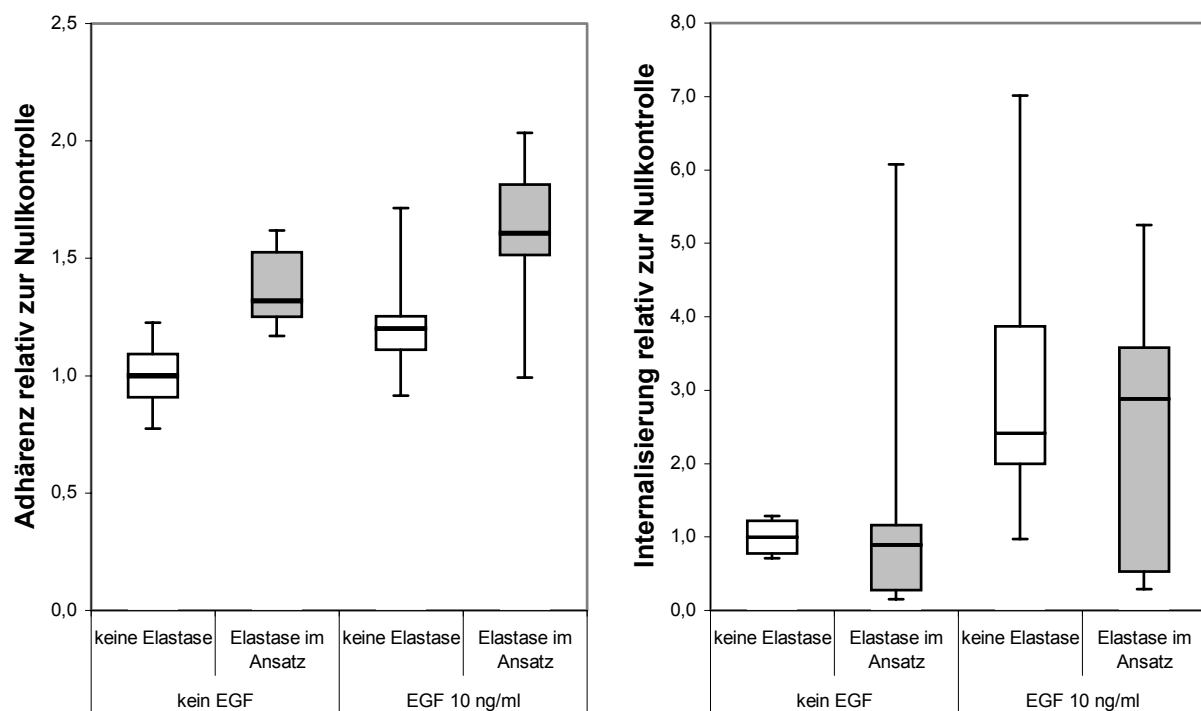
Tab. 3.22: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2980 in T24-Zellen. n = 10.Abb. 3.11: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von *E. coli* 2980 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. Im Infektionsansatz lag Elastase vor ($A_{Ela} = 0,05$ U/ml). n = 10.

d) *E. coli* 2313 – Elastasezugabe zum Infektionsansatz

Adhärenz		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz	keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz
cfu /ml (x1000)	Med	165,0	205,0	207,0	264,0
	MW	186,8	257,0	228,8	311,5
	SD	87,39	124,61	105,89	181,53
	p	0,052		0,247	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	1,32	1,20	1,61
	MW	1,0	1,37	1,22	1,60
	SD	0,14	0,16	0,24	0,31
	p	<0,001*		0,009*	

Tab. 3.23: absolute und relative Adhärenzen von *E. coli* 2313 an T24-Zellen. n = 10.

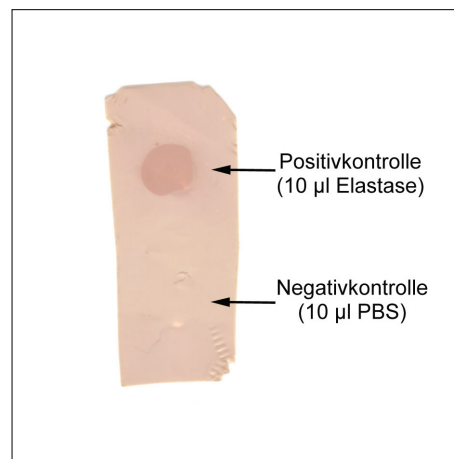
Internalisierung		kein EGF		EGF 10 ng/ml	
		keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz	keine Elastase	Elastase im Infektionsansatz
cfu /ml (x10)	Med	54,0	52,0	284,0	132,5
	MW	149,5	59,5	277,6	125,8
	SD	181,91	24,86	198,38	50,83
	p	n.s.		n.s.	
errechnete Verhältnisse	Med	1,0	0,89	2,41	2,88
	MW	1,0	1,41	3,19	2,44
	SD	0,23	1,83	2,05	1,86
	p	n.s.		n.s.	

Tab. 3.24: absolute und relative Internalisierungen von *E. coli* 2313 in T24-Zellen. n = 10.Abb. 3.12: Adhärenz (links) und Internalisierung (rechts) von *E. coli* 2313 an T24-Zellen, errechnete Verhältnisse. Im Infektionsansatz lag Elastase vor ($A_{Ela} = 0,05$ U/ml). n = 10.

3.2 Kontrolle der isolierten Elastaseantikörper

Die Durchführung der Kontrolle ist in 2.6.2 beschrieben. Wie auf Abbildung 3.13 zu erkennen ist, wurde die auf der Nitrozellulose immobilisierte Elastase angefärbt, während die mit PBS betropfte Stelle farblos geblieben ist. Damit war das Vorhandensein funktionierender Antikörper gegen Elastase in der Lösung nachgewiesen, eine Kreuzreaktivität mit Casein oder Strukturen der Nitrozellulose konnte ausgeschlossen werden.

Abb. 3.13: Nitrozelluloseplatte mit Elastase und PBS nach POD-Reaktion



3.3 indirekte Immunfluoreszenz

Die Versuche, eventuell an der Oberfläche gebundene Elastase auf *E. coli* nachzuweisen, erbrachten mit keiner der verwendeten Antikörperkonzentrationen in mehreren unabhängigen Experimenten einen Hinweis auf eine verstärkte Markierung der mit Elastase behandelten Bakterien. Zwar waren einzelne Bakterien markiert, aber es gab keinen klaren Unterschied zwischen den beiden Gruppen, sodass die Bakterienmarkierung am ehesten mit gegen *E. coli* gerichteten Antikörpern zu erklären ist, die trotz Isolierung der elastasespezifischen Antikörpern vereinzelt noch in der AK-Präparation vorlagen. Dafür spricht die Beobachtung, dass bei Verwendung der gesamten AK-Fraktion, wie vom Hersteller geliefert, in beiden Gruppen eine gleiche und deutlich stärkere Anfärbung zu erkennen war.

3.4 Dotblot

Auch bei der Anfärbung der Dotblots in fünf unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen ergab sich kein Hinweis auf eine nach der Behandlung noch vorliegende Elastase an den Bakterien. Wie auf Abb. 3.14 zu er-

kennen ist, blieben alle mit Bakterien beladenen Felder ungefärbt. Die leichte Anfärbung bei 2313 und 2980 in der Verdünnungsstufe 1 : 16 wird als Artefakt angesehen, wie es auf allen Dotblot-Platten vorkommt. Zumindest ist kein mit der Positivkontrolle vergleichbares Signal erkennbar.

Die runden Abdrücke auf den Platten sind durch das Andrücken der Düsen bei der Beladung entstanden. Sie umschließen die beladenen Areale, die ungefärbt bleiben.

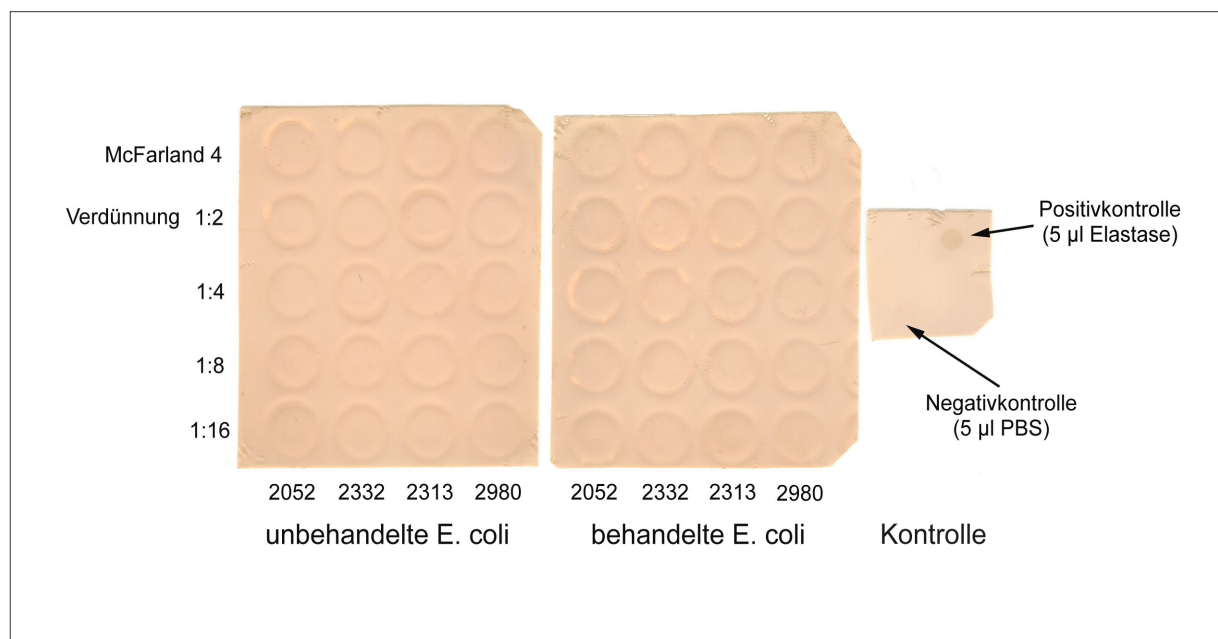


Abb. 3.14: Dotblot-Platten mit unbehandelten und behandelten *E. coli* sowie der mitgeführten Positiv- und Negativkontrolle. Antikörperkonzentrationen: Anti-Elastase-Ak 1:75, Ziege-anti-Kaninchen (Zak-POD) 1:1000 (s. 2.8.2).

3.5 Internalisierung von Latexpartikeln

Sowohl die mit Elastase beladenen Latexpartikel als auch die mit Albumin behandelten wurden nur in sehr geringem Umfang in die Zellen aufgenommen: Nur ca. jede fünfzigste Zelle hatte einen und selten mehrere Partikel internalisiert. Ein Unterschied zwischen Elastase- und Albumin-beladenen Partikeln war nicht erkennbar. Offensichtlich reicht die Anwesenheit von Elastase allein nicht aus, um eine verstärkte Aufnahme von entsprechenden Partikeln auszulösen.

3.6 Messung der proteolytischen Aktivität gegenüber Azocasein

Die enzymatische Aktivität der vier *E.coli*-Stämme gegenüber Azocasein ändert sich durch die Behandlung mit Elastase nicht. Die in Tabelle 3.25 aufgeführten und in den Abbildungen 3.14 grafisch dargestellten Ergebnisse zeigen weder bei den behandelten noch bei den unbehandelten Bakterien einen Anstieg der Extinktion, geschweige denn einen signifikanten Effekt. Die mitgeführten Standards, in den Diagrammen in Abb. 3.15 als gestrichelte Linien dargestellt, zeigen die proteolytische Aktivität der Elastase gegenüber Azocasein und dienen somit zugleich als Null- und Positivkontrolle. Die genauen Ergebnisse der Standards finden sich in Tab. 3.26.

Wegen des offensichtlich nicht vorhandenen Unterschieds der behandelten und unbehandelten Bakterien wurde kein statistischer Test durchgeführt. In den Tabellen 3.25 und 3.26 sind die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen sowie die Standardabweichungen aufgeführt. Auf die Eintragung der Standardabweichungen als Fehlerbalken in die Diagramme wurde der Übersicht halber verzichtet.

Bakterienstamm			0 min	45 min	90 min
unbehandelt	2052	MW	0,199	0,200	0,213
		SD	0,058	0,045	0,051
	2332	MW	0,182	0,183	0,180
		SD	0,012	0,026	0,018
	2980	MW	0,196	0,202	0,207
		SD	0,010	0,009	0,009
	2313	MW	0,219	0,220	0,225
		SD	0,027	0,039	0,055
	2052	MW	0,165	0,190	0,182
		SD	0,029	0,036	0,028
behandelt mit Elastase ($A_{\text{Ela}} = 0,1 \text{ U/ml}$; $t = 30 \text{ min}$)	2332	MW	0,174	0,184	0,184
		SD	0,018	0,028	0,024
	2980	MW	0,179	0,194	0,195
		SD	0,031	0,035	0,035
	2313	MW	0,218	0,213	0,225
		SD	0,036	0,015	0,032

Tab. 3.25: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der gemessenen Extinktionen der Überstände bei $\lambda = 336 \text{ nm}$. Die Messwerte der Standards finden sich in Tab. 3.26. $n = 6$.

Als Standard der Messung wurden wie beschrieben eine Nullkontrolle mit PBS sowie drei bekannte Elastasekonzentrationen, nämlich 0,05, 0,1 und 0,5 U/ml in PBS, mitgeführt. Die erhaltenen Messkurven sind in den Diagrammen in Abb. 3.15 jeweils als grau gestrichelte Linien in den Diagrammen mit dem proteolytischen Verhalten der behandelten und unbehandelten *E.coli*-Stämme eingefügt. Der besseren Übersicht halber sind die Standardabweichungen dort nicht eingetragen. Diese sind, da für die Messung aller vier Bakterienstämme gleich, in Tabelle 3.26 aufgeführt. Da bei den Messungen nach 90 min die Standardabweichungen der vier Messreihen nicht überlappen, kann von einem signifikanten Unterschied ausgegangen werden. Ein weiterer statistischer Test wurde daher nicht durchgeführt. Nach 45 min ist zumindest teilweise ebenfalls keine Überlappung mehr gegeben. In Abbildung 3.16 findet sich die grafische Darstellung der Eichkurven mit den die Standardabweichung anzeigenden Fehlerbalken.

Messreihe		0 min	45 min	90 min
Nullkontrolle (PBS)	MW	0,197	0,210	0,203
	SD	0,033	0,050	0,040
A_{Ela} = 0,05 U/ml	MW	0,191	0,239	0,274
	SD	0,014	0,028	0,018
A_{Ela} = 0,1 U/ml	MW	0,190	0,274	0,374
	SD	0,013	0,025	0,035
A_{Ela} = 0,5 U/ml	MW	0,199	0,679	1,029
	SD	0,034	0,055	0,065

Tab. 3.26: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der Messwerte für die Standards der Messung der proteolytischen Aktivität gegenüber Azocasein. n = 6.

Die Nullkontrolle wurde wie in 2.9.4 beschrieben durchgeführt. Als Eichleerwert diente eine Probe mit 3 ml PBS. Die Erfassung der Extinktion erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 10, 25, 40, 60, 75 und 90 min. Wie auf Abbildung 3.17 zu erkennen ist, ergab sich keine Änderung der Extinktion, sodass die Vitalität oder Denaturierung der Bakterien offensichtlich keinen Einfluss auf die Konzentration an chromophoren Spaltprodukten in der Messlösung hat.

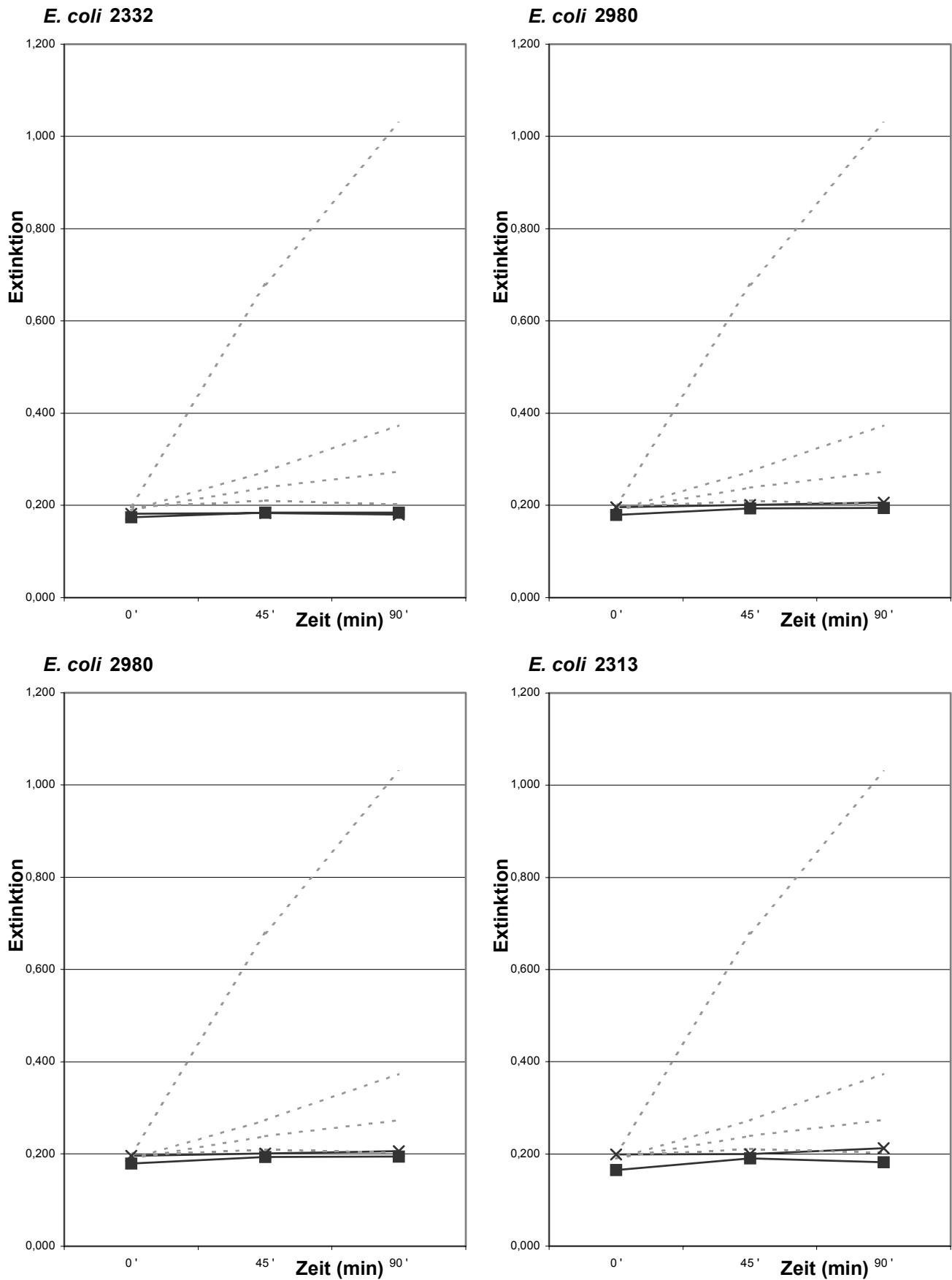


Abb. 3.15: Verlauf der Extinktionen (Mittelwerte) bei $\lambda = 336$ nm nach 0, 45 und 90 min bei 37°C. *E. coli* unbehandelt (Kreuze) und mit $A_{Ela} = 0,1$ U/ml behandelt (Quadrate). Die grau gestrichelten Linien zeigen die Extinktion der Standards (s. Abb. 3.16). n = 6.

Abb. 13.16: Messung der proteolytischen Aktivität gegenüber Azocasein.

Nullkontrolle (Quadrate),
 $A_{Ela} = 0,05 \text{ U/ml}$ (Dreiecke),
 $A_{Ela} = 0,1 \text{ U/ml}$ (Kreuze) und
 $A_{Ela} = 0,5 \text{ U/ml}$ (Kreise).

Verlauf der Extinktionen bei
 $\lambda = 336 \text{ nm}$ nach 0, 45 und 90 min bei 37°C , $n = 6$.

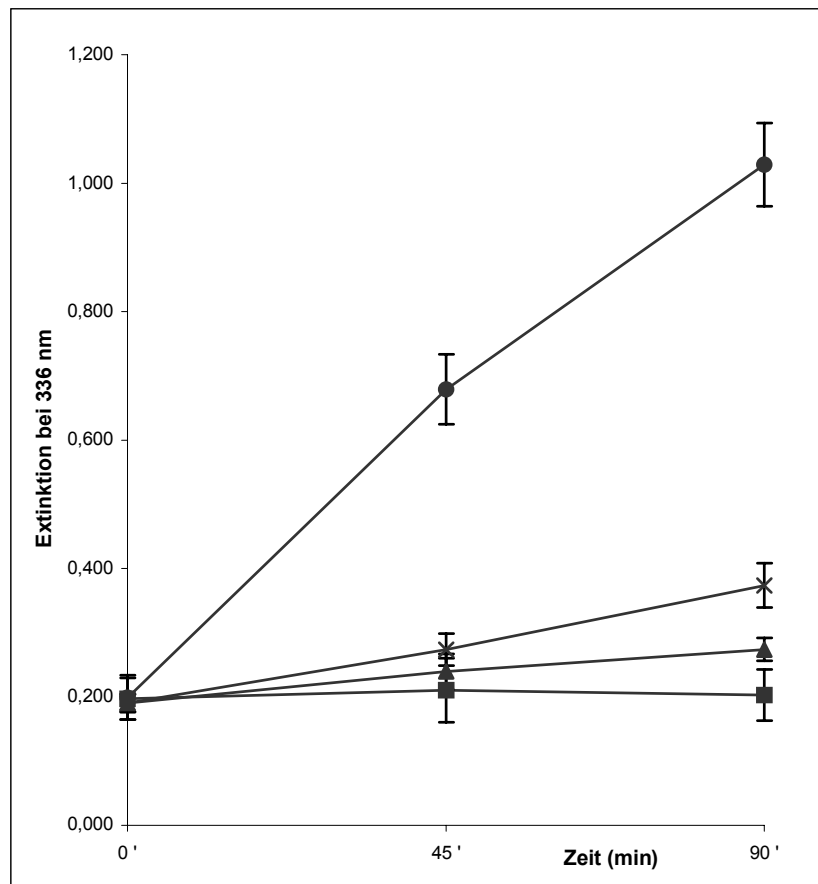
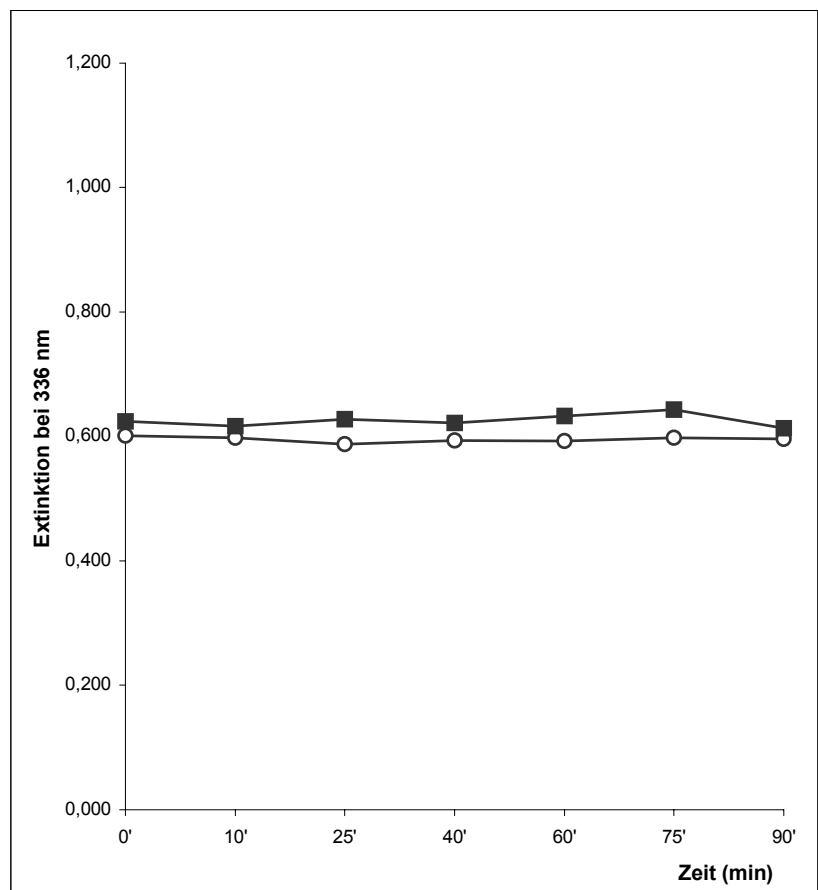


Abb. 3.17: Verlauf der Extinktion bei $\lambda = 336 \text{ nm}$; vitale Bakterien (Kreise) vs. abgetötete Bakterien (Quadrate). $n = 1$.



4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

Für die experimentelle Untersuchung von Infektionsmechanismen, hier bezogen auf HWI, stehen grundsätzlich zwei verschiedene Modelle zur Verfügung: Zum einen in vitro-Untersuchungen an Zellkulturen oder anderen geeigneten Medien, z.B. Membranen oder synthetischen Oberflächen, zum anderen Tierexperimente. Ergänzt werden diese Infektionsmodelle durch epidemiologische Untersuchungen hinsichtlich möglicher Risikofaktoren bei Patienten, die einen HWI erlitten haben, und hinsichtlich der molekularbiologischen Eigenschaften der Erreger in Korrelation zur klinischen Charakteristik der HWI. Die beiden o.g. Infektionsmodelle haben jeweils Vor- und Nachteile und besitzen spezifische Einschränkungen, die die Beurteilbarkeit hinsichtlich einer Allgemeingültigkeit der Befunde beeinträchtigen.

Das Zellkultur-Modell bietet eine einfache und vielfach genutzte Möglichkeit, die Interaktion zwischen Bakterien und Zellen zu untersuchen. Die zugesetzten Wirkstoffe bleiben bis ins Detail kontrollierbar, eine Besiedlung mit anderen Erregern, zumindest Bakterien oder Pilzen, kann ausgeschlossen werden. Die Methode erlaubt eine Fokussierung auf den zu untersuchenden Faktor und eignet sich sehr gut zur selektiven Erfassung einzelner Wirkstoffe oder Einflussmöglichkeiten. Eine große Zahl von Störfaktoren, die im lebenden Organismus vorhanden sind, bleibt ausgeschaltet; dazu zählen neben anatomischen und physiologischen Gegebenheiten (z.B. Harnstrom, Peristaltik, Uromukoid, veränderliche Zusammensetzung des Urins, Unterschiede in der Anatomie von Nieren und ableitenden Harnwegen zwischen den einzelnen Tieren bzw. Probanden) vor allem die Aktionen des spezifischen und unspezifischen Abwehrsystems des Wirts. Die Wirte haben gegenüber HWI eine außerordentlich differenzierte Abwehr entwickelt, deren Einfluss auf die Erreger im Tierexperiment im einzelnen nicht zu quantifizieren ist (s. 4.4). Zellkulturversuche sind relativ gut reproduzierbar und werfen viel weniger ethische und rechtliche Schwierigkeiten auf als Tierexperimente. Wegen dieser Vorteile ist die Zellkultur mit verschiedenen Zelllinien ein weit verbreitetes und gut untersuchtes Infektionsmodell, nicht nur für HWI (u.a. Straube et al. 1993 und 2000, Martinez et al. 2000, Miyazaki et al. 2002a).

Allerdings ist die Übertragbarkeit von Erkenntnissen, die in Zellkulturversuchen gewonnen wurden, sehr eingeschränkt. Sie müssen in der Regel im Tierversuch auf ihre Allgemeingültigkeit hin überprüft werden. Für Tumorzelllinien wie die verwendeten T24-Zellen gilt darüber hinaus, dass sie transformierte, permanent wachsende Zellen sind, die ihre Ursprungsgewebe, in diesem Fall das normale Urothel, nur unvollkommen repräsentieren.

Für das Tierexperiment gelten entsprechend gegensätzliche Bewertungen. Es existiert mit dem Mausmodell der aufsteigenden HWI ein gut etablierter und häufig untersuchter Ansatz (siehe u.a. Conell et al. 1996, Mulvey et al. 1998, Frendéus et al. 2001). Die Vorteile liegen in einem sehr realistischen Modell mit relativ guter Übertragbarkeit auf den Menschen. Es ist aber in seiner Vielzahl von Einflussmöglichkeiten und Störfaktoren schwer einschätzbar und erlaubt nur schlecht die Untersuchung einzelner Faktoren auf molekularer Ebene.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung eines einzelnen proteolytischen Enzyms bezüglich seiner Wirkung auf den Verlauf und die Quantität von Adhärenz und Internalisierung von Bakterien in einem experimentellen Infektionsmodell unter der Ausgangshypothese, dass es zu einer Prozessierung von Oberflächenantigenen der Bakterien und/oder der Wirtszellen kommen könnte. Elastase kommt, wie bereits unter 1.5.2 ausgeführt, im Urin gesunder Personen in geringer Konzentration vor und erfährt, zumindest bei Neugeborenen, bei einem HWI eine Konzentrationssteigerung um den Faktor 10-20 innerhalb der ersten Stunden des HWI (Bakakos et al. 2002). Auch von allen zur Verfügung stehenden Versuchstieren wird Elastase in mehreren Isoformen synthetisiert. Eine Vorbehandlung der Bakterien mit Elastase bei Tierversuchen wäre also von fragwürdiger Bedeutung, da sie mit Sicherheit auch im Wirtorganismus mit Elastase in Kontakt kommen würden und eine Differenzierung der überlagerten Effekte nicht mehr möglich wäre. Die bisher einzigen Arbeiten, in denen Leukozyten-Elastase-defiziente Knock-out-Mäuse eingesetzt wurden, beschäftigten sich mit der Antwort auf systemische Infektionen, wobei die Erreger intraperitoneal appliziert wurden (Belaouaj et al. 1998) sowie mit der Aktion von Granulozyten dieser Mäuse gegenüber Bakterien *in vitro* (Belaouaj et al. 2000). Untersuchungen zu HWI mit der hier gewählten Fragestellung sind bisher nicht publiziert worden.

In Anbetracht der oben ausgeführten Überlegungen wurde für die Experimente, die dieser Dissertation zu Grunde liegen, das Infektionsmodell der Zellkultur gewählt, um

damit die Elastasewirkung selektiv zu untersuchen. Als infizierter Organismus wurde mit den T24-Zellen die Zelllinie eines humanen Urothelkarzinoms verwendet. Das Urothel bildet die erste Oberfläche, mit denen die Erreger nach dem Eindringen in die ableitenden Harnwege in Kontakt treten. Die Bakterien müssen zur Besiedlung der Harnwege eine Adhärenz und Internalisierung an bzw. in die Urothelzellen als ersten Schritt realisieren. Dabei kommt es bereits in diesem Stadium zu einer Signalaktivierung bis in das Zytoskelett sowie über Zytokine (Fünfstück et al. 2001) und Aktivierung von zellgebundenen Rezeptoren, z.B. dem intracellulär Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) (Agace et al. 1995) zu einer Triggerung der Immunabwehr mit einem sehr raschen Einwandern von neutrophilen Granulozyten, so dass neben anderen Stoffen auch sehr früh Elastase in den ableitenden Harnwegen des Wirts vorhanden ist (s. 1.5.2, 4.4). Das Urothel bildet damit nicht nur eine mechanische Barriere, sondern ist auch das erste an der Infektionsabwehr beteiligte Organ. Daher lag es nahe, die Versuche mit diesen Zellen durchzuführen. Auch andere Autoren haben dieses Vorgehen gewählt (u.a. Ölschläger et al. 1994, Miyazaki et al. 2002a). Neben den T24-Zellen existieren eine Reihe weiterer Zelllinien urothelialen Ursprungs, mit denen Infektionsversuche in einem HWI-Modell unternommen worden sind, z.B. die humanen Blasenepithelzellkarzinom-Linien 5637 und J82 (Martinez et al. 2000). Zelllinien, die aus anderen Zelltypen etabliert wurden, wurden ebenfalls als HWI-Modelle verwendet, so z.B. LLC-PK₁, eine porkine Nierentubulus-Linie (Straube et al. 1992, 1993) und A498, eine humane Nierenzellkarzinom-Linie (Frendéus et al. 2001). Für die T24-Zellen liegen valide und sicher reproduzierbare Erfahrungen vor, außerdem ist diese Zelllinie gut hinsichtlich ihrer Zytokinexpression nach einer Infektion (Fünfstück et al. 2001) und ihrem Verhalten in Gegenwart von EGF charakterisiert (Straube et al. 2000).

Dem Vorteil einer selektiven Untersuchung der Elastase in verschiedenen Angriffspunkten (Zellen allein vorbehandelt, Bakterien allein vorbehandelt, Elastase im Infektionsansatz) steht die mangelnde Übertragbarkeit auf HWI im lebenden Organismus gegenüber. Es ist unklar und kann auch in dem gewählten Infektionsmodell nicht untersucht werden, ob der beobachtete Effekt auch in vivo zur Virulenzsteigerung führt. Die sich aus dieser Situation ergebenden Fragen werden im Folgenden ausführlicher diskutiert.

4.2 Fehlerbetrachtung

Bei den durchgeführten Versuchen kommt eine Reihe von Fehlern in Betracht, die die präsentierten Ergebnisse in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen.

Bei den Versuchen zur Adhärenz und Internalisierung ist die Variabilität im Zellzyklus der T24-Zellen in der Kultur als Fehlermöglichkeit zu nennen. Es ist davon auszugehen, dass sich in jeder eingesetzten Kultur unterschiedliche Anteile von Zellen im Proliferationszustand einerseits und in der Ruhephase andererseits befanden. Unter der Annahme, dass sich die Expression von Oberflächenrezeptoren innerhalb des Zellzyklus ändert, ist auch eine Abhängigkeit der rezeptorabhängigen Adhärenz und Internalisierung vom Zellzyklus wahrscheinlich. Zwar wurde durch ein möglichst genaues Einhalten der Kulturbedingungen hinsichtlich Anzahl der eingesäten Zellen, Zusammensetzung der Medien, Temperatur, CO₂-Gehalt der Atmosphäre im Brutschrank, Zeiten der Wachstums- und Hungerphasen und Zugabe von EGF in genau definierten Mengen und Zeitabständen angestrebt, aber eine vollständige Übereinstimmung im Vergleich der einzelnen Versuche konnte mit Sicherheit nicht erreicht werden. Um diesem Unsicherheitsfaktor zu begegnen, wäre eine Möglichkeit der Phasensynchronisation im Zellzyklus wünschenswert; diese existiert aber bisher für die benutzten Zellkulturen nicht. Die Annahme einer phasenabhängigen Adhärenz und Internalisierung wird durch die hohe interexperimentelle Variabilität der Messwerte gestützt, die auch bei mehreren, an aufeinander folgenden Tagen durchgeführten Experimenten den Faktor 4-5 erreichen konnte. Wie unter 2.10 beschrieben, wurde diesem Umstand durch die Standardisierung auf Steigerungen (relative Adhärenz und Internalisierung) Rechnung getragen.

Hinzu kommt die bereits erwähnte Instabilität der Zelllinie bei Passagezahlen von mehr als ca. 25. Es war ein deutlicher Abfall der Adhärenz- und Internalisierungsraten erkennbar, auch kam es zum vermehrten Absterben der Zellen in der Kultur. Diesem Umstand wurde, wie in 2.2 beschrieben, durch eine Neuetablierung konservierter Zellen und Verwertung der Ergebnisse von Versuchen nur in den (als sicher angesehenen) Passagezahlen 5-20 begegnet, dennoch ist auch ein Einfluß des Alters der Zelllinie auf die Messergebnisse nicht klar zu quantifizieren und führt zu Unsicherheiten in der Beurteilung.

Die Keimzahlbestimmung mittels Extinktionsmessung besitzt für stäbchenförmige Bakterien, die eine so hohe Umweltstabilität besitzen wie *E. coli*, eine hinreichend gute Präzision und liefert relativ gut vergleichbare Werte. Da sich die Auswertungen auf die Steigerungsraten durch EGF und Elastase beziehen und nicht auf absoluten Messwerten beruhen, haben geringe Abweichungen in der Keimzahl auch keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Die Antikörpermarkierungen sind mit einer gewissen Unsicherheit hinsichtlich der Reinheit der Antikörper behaftet. Konjugatkontrolle und Nullkontrollen waren zwar negativ, dennoch kann ein Rest von Antikörpern gegen *E. coli*-Antigene nicht sicher ausgeschlossen werden. Zudem waren die Signale relativ schwach und lagen möglicherweise unter der Nachweisgrenze des Systems. Dem wurde durch den Einsatz verschiedener Konzentrationen von Antikörpern, Färbereagenz und Blocklösung in mehreren unabhängigen Experimenten Rechnung getragen. Dabei konnte keine positive Reaktion nachgewiesen werden.

Die Messung von proteolytischen Aktivitäten mittels Extinktionsmessung ist ein etabliertes und relativ präzises System. Auf die gute Messqualität deuten die geringe Streuung der Messwerte und die sich daraus ergebenden kleinen Standardabweichungen hin. Die Möglichkeit, dass die Bakterien durch Aufnahme der chromophoren Spaltprodukte die Ergebnisse verfälschen könnten, wurde ausgeschlossen (s. 3.6). Dennoch bildet die Anwesenheit von vermehrungsfähigen Organismen eine mögliche Fehlerquelle, auch wenn der Vergleich zwischen unbehandelten und behandelten Bakterien und der Nullkontrolle keinen Hinweis darauf ergibt.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Beeinflussung von Adhärenz und Internalisierung durch Elastase

Sowohl die Behandlung der Bakterien allein vor der Infektion als auch die Anwesenheit von Elastase im Infektionsansatz führte zu einer Erhöhung der Adhärenz und z.T. auch der Internalisierung. Die Behandlung der Zellen vor der Infektion hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss. Damit liegt der Schluss nahe, dass die beobachteten Wirkungen der Elastase auf einer wie auch immer gearteten Beeinflussung der bakteriellen Adhäsine und/oder der internalisierungsauslösenden Antigene beruhen. Offensichtlich verbessert die Anwesenheit von Elastase die Fähigkeit der Bakterien,

die Zellen zu infizieren; per definitionem (s. 1.3) kommt es also zu einer Virulenzsteigerung.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den vier Stämmen hinsichtlich der Beeinflussung von Adhärenz und Internalisierung ließ sich nicht feststellen. Die Aufstellung der Antigencharakteristik (s. 2.1.2) zeigt, dass alle vier Stämme über Typ1- und F1C-Fimbrien verfügen. P-Fimbrien werden ebenfalls von allen Stämmen exprimiert, allerdings zwei unterschiedliche F-Typen: F8 von 2980 und 2313, F14 von 2052 und 2332. Alle tragen das O18-Antigen; die beiden Wildstämme 2052 und 2980 sind bekapselt (K-Antigen 5), die beiden Mutanten 2332 und 2313 besitzen keine Kapsel. Das H-Antigen (H5) ist nur bei 2980 und 2313 vorhanden. Mit α -Hämolysin verfügen drei der vier Stämme auch über einen der sezernierbaren Virulenzfaktoren, nur 2313 exprimiert ihn nicht. Es finden sich also durchaus Unterschiede im Antigenbesatz zwischen den vier Stämmen, sodass bei Unterschieden im Adhärenz- und Internalisierungsverhalten auf einen Angriffspunkt der Elastase hätte geschlossen werden können.

Es bleibt ein Hinweis auf einen möglichen Angriffspunkt: Der fehlende Unterschied zwischen kapseltragenden und kapsellosen *E. coli* lässt vermuten, dass die Virulenzfaktoren beeinflusst werden, die über die Kapselstrukturen hinausragen, also die Fimbrien. Weitergehende Schlüsse auf die Strukturen, deren Beeinflussung den Elastaseeffekt erklären würde, lassen die beschriebenen Antigene nicht zu.

Über afimbriale Adhäsine verfügen die vier untersuchten Stämme nicht (A. Käßner, persönliche Mitteilung), über die weiteren, in der Literatur beschriebenen Virulenzfaktoren von UPEC wie Dr-Adhäsine, S-Fimbrien o.ä. liegen keine Erkenntnisse vor. Zur Klärung müssten tiefer gehende Untersuchungen vorgenommen werden; die möglichen Ansätze und die daraus abzuleitenden Hypothesen werden im Folgenden diskutiert.

Es stellt sich die Frage, inwieweit der Elastaseeffekt konzentrationsabhängig ist. Die Versuche, die das klären sollten, stießen auf so schwer wiegende methodische Schwierigkeiten, dass die Ergebnisse weder valide noch reliabel waren; auf eine Darstellung der Daten wurde der Übersicht halber verzichtet. Die Probleme stellen sich wie folgt dar: Die Behandlung der Bakterien mit verschiedenen Elastasekonzentrationen erforderte eine getrennte Inkubation der einzelnen Proben. Erst danach

konnten die Proben auf die standardisierte Keimzahl eingestellt werden. Dieses geschah, wie unter 2.4 dargestellt, mittels einer Extinktionsmessung. Diese Methode hat eine gewisse Ungenauigkeit, die bei einer großen Anzahl von Proben eine Vergleichbarkeit immer mehr erschwert. Hinzu kommt, dass die Einstellung von mehreren Suspensionen einige Zeit braucht; bis zum Beginn der Infektion waren in den zuerst eingemessenen Proben die Bakterien sehr wahrscheinlich schon in die Vermehrungsphase eingetreten. Von einer Vergleichbarkeit der Keimzahlen und der Infektionsbedingungen war also nicht mehr auszugehen. Die durchgeführten Vorversuche mit verschiedenen Elastasekonzentrationen ($A_{\text{Ela}} = 0,05, 0,1, 1,0$ und $2,0$ U/ml) zeigten entsprechend sehr große, zufällige Streuungen von Adhärenz und Internalisierung, die Validität und die Reproduzierbarkeit waren sehr gering. Es wäre sicherlich interessant, diese Untersuchung unter geeigneten Versuchsbedingungen zu wiederholen.

Auch die Anwesenheit von verschiedenen Elastasekonzentrationen im Infektionsansatz war mit dem verwendeten Infektionsmodell nicht valide untersuchbar. Wie schon unter 3.1.2 erwähnt, führte bereits eine $A_{\text{Ela}} = 0,1$ U/ml zu einer so großen Ablösung der Zellen von der Kulturplatte, dass eine Vergleichbarkeit nicht mehr gegeben war. In höheren Konzentrationen kam es überdies zu einer direkten Zelllyse als Folge der Elastasewirkung auf die T24-Zellen. Auch hier wäre eine erneute Untersuchung mit einem besser adaptierten Ansatz wünschenswert.

4.3.2 Einfluss von EGF auf die Internalisierung von behandelten und unbehandelten *E. coli*

Die Auswertung der Ergebnisse von Adhärenz und Internalisierung bei Vorbehandlung der Bakterien mit Elastase (s. 3.1.1) ergibt, dass die Internalisierung von behandelten Bakterien nur dann signifikant erhöht ist, wenn gleichzeitig EGF im Infektionsansatz vorhanden ist. Im Gegensatz dazu ist die Adhärenz durch die Zugabe von EGF wenig zu beeinflussen, und die Vorbehandlung mit Elastase führt zu einer Adhärenzsteigerung, die in den meisten betrachteten Fällen deutlich über der Steigerung durch EGF liegt. Diese Beobachtung ließ sich auch bei der Anwesenheit von Elastase im Infektionsansatz reproduzieren.

Die Zellkulturen wurden vor der Infektion für 18 Stunden einer Hungerphase mit serumfreien DMEM unterworfen. Ziel dieses Vorgehens war, die Stimulierung der Zellen durch Wachstumsfaktoren, die sich vielen neben anderen Proteinen im fetalen

Kälberserum finden, zu unterbinden und den Effekt von EGF möglichst isoliert betrachten zu können. EGF führt bei Zellen in Kultur, vor allem Tumorzellen wie den verwendeten T24-Zellen, zu einer deutlichen Anregung des Wachstums und Veränderung der Expression von Oberflächenantigenen, Bestandteilen des Zytoskeletts, Molekülen der intrazellulären Signalkaskaden und anderen Proteinen (Messing EM et al. 1987, Messing und Reznikoff 1987, Kanno et al. 1998). Vermutlich wird auch die Präsentation von Oberflächenantigenen auf den Zellen verstärkt.

Die Internalisierung von Bakterien ist ein aktiver Vorgang, der an das Vorhandensein spezifischer Rezeptoren für bakterielle Antigene auf der Oberfläche der Wirtszelle geknüpft ist. Verschiedene Oberflächenantigene von UPEC sind in der Lage, eine Internalisierung in Blasenepithelzellen auszulösen, so die FimH-Untereinheit der Typ1-Fimbrien (Mulvey et al. 1998), die afimbrialen Adhäsine afaD und afaE (Jouve et al. 1997) und die Dr-Adhäsine (Nowicki et al. 2001, Ölschläger et al. 2002). Für diese Antigene existieren offensichtlich verschiedene Rezeptoren, die jeder für sich oder in ihrer Gesamtheit aktiviert werden können oder müssen: FimH triggert über die Bindung an Uroplakine Ia und Ib auf Urothelzellen die Internalisierung (Pak et al. 2001). Shin et al. beschrieben eine Aufnahme von *E. coli* in Mastzellen, die aus Maus-Knochenmark kultiviert waren, via Bindung von FimH an den Rezeptor CD48, der auf den Mastzellen in enger Verbindung mit Caveolin in den sog. Caveolae auf der Zelloberfläche vorkommt (Shin et al. 2000). Dieser Aufnahmemechanismus ist auch bei anderen Immunzellen zu beobachten und vom Ablauf her deutlich vom klassischen Endosom-Lysosom-Weg zu unterscheiden (Shin und Abraham 2001). Auch die meisten anderen Zellen im menschlichen Körper besitzen Caveolae (Shin und Abraham 2001), die auch an anderen Stellen wichtig für die Internalisierung sind: Sukumaran et al. zeigten, dass *E. coli* K1 in einem Modell mit menschlichen Gehirn-Endothelzellen (human brain microvascular endothelial cells, HBMEC) Caveolin und die Proteinkinase C α benötigen, um in die Zellen internalisiert zu werden und der Verschmelzung des Endosoms zu einem Lysosom zu entgehen (Sukumaran et al. 2002). Es ist anzunehmen, dass auch die T24-Zellen über Caveolin verfügen; unter der Annahme, dass dieses durch die Anwesenheit von EGF stärker exprimiert wird, ist so ein möglicher Erklärungsweg für die beobachtete Synergie zwischen EGF und Elastasevorbehandlung gegeben. Außerdem führt die Aktivierung des EGF-Rezeptors zu einer erhöhten intrazellulären Tyrosinkinase-Aktivität; eine Tyrosinphosphorylierung des intrazellulären Abschnitts des Caveolins führt zu einer ver-

stärkten Aggregation zu Caveolen, so dass diese Strukturen den adhärierenden *E. coli* wahrscheinlich in größerer Zahl zur Verfügung stehen.

Martinez und Hultgren zeigten, dass Typ1-fimbrierte *E. coli* zur Aufnahme in Urothelzellen in vitro die Anwesenheit und das Funktionieren von GTPasen der Rho-Familie, namentlich RhoA, Cdc42 und Rac1, benötigen (Martinez und Hultgren 2002). Diese Moleküle sind auch an den Wachstumsfaktor-induzierten Membranveränderungen und Umstellungen im Zytoskelett beteiligt, die schon vor einigen Jahren bei Zellen in Kultur beobachtet wurden (Bliska et al. 1993). Auch hier ist ein Angriffspunkt des EGF denkbar.

In der Zusammenschau kann aus den vorliegenden Ergebnissen der genaue Mechanismus nicht erschlossen werden. Zu vermuten ist, dass die Steigerung der Internalisierung auf der vermehrten Expression und/ oder Präsentation von Rezeptoren für Adhäsine und Internalisierungs-auslösende bakterielle Antigene beruht. Unter 4.3.1 wurde bereits ausgeführt, dass eine Beeinflussung vor allem von fimbrialen, also über die Kapsel hinausragenden Strukturen auf den *E. coli* als Erklärung für den Elastaseeffekt vermutet werden kann. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Abhängigkeit der Internalisierung von Typ1-Fimbrien tragenden *E. coli* von Molekülen der intrazellulären Signaltransduktion, die ihrerseits wiederum in engem funktionellem Zusammenhang mit dem EGF-Rezeptor stehen (Bliska et al. 1993, Martinez und Hultgren 2002). Insofern passen die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Anwesenheit und Abwesenheit des EGF im Infektionsansatz zu den Ergebnissen in der Literatur und stützen die o.g. These von der Beeinflussung fimbrialer Strukturen.

4.3.3 Wird Elastase an die Bakterienoberfläche gebunden?

Der Wirkmechanismus, über den Elastase die Adhäsions- und Invasionsfähigkeiten der *E. coli* steigert, bleibt nach den vorliegenden Ergebnissen unklar. Zwei möglichen Ansätzen wurde experimentell nachgegangen: Erstens, so die Arbeitshypothese, könnte allein die Anwesenheit von Elastase auf der Oberfläche von Bakterien oder auch unbelebten Partikeln die Internalisierung dieser Partikel fördern. Diese Möglichkeit wurde von Anfang an als nicht wahrscheinlich angesehen, eine Abklärung war aber erforderlich. Die zu diesem Zweck durchgeführte Internalisierung von beladenen Latexpartikeln ergab keinen Hinweis auf einen solchen, von Seiten der Bakterien passiven Vorgang. Auch die Ergebnisse anderer Autoren sprechen gegen einen sol-

chen Mechanismus: In den von Belaaouaj et al. durchgeführten Experimenten mit Leukozyten-Elastase defizienten Knock-out-Mäusen war die Aufnahme der Bakterien in die Leukozyten nicht gestört; deutlich eingeschränkt war hingegen der intrazelluläre Abbau (Belaaouaj et al. 2000).

Wie oben bereits ausgeführt, beruht der Elastaseeffekt sehr wahrscheinlich auf einer Beeinflussung der Bakterien und nicht auf einer direkten Wirkung auf die Zellen. Aus diesen Überlegungen ergibt sich der zweite experimentelle Ansatz. Bei verschiedenen Bakterienspezies ist eine Bindung von extrazellulären Proteinen des Wirts bekannt; dieses bewirkt in vielen Fällen eine Virulenzsteigerung. Auch das „Einfangen“ und Einsetzen von proteolytischen Enzymen durch Bakterien im Rahmen von Infektionen ist beschrieben. So binden Streptokokken diverse Proteine des Wirts, u.a. Plasminogen, Immunglobuline, Albumin und Fibrinogen (Schmidt et al. 1993, Bergmann et al. 2001). Darüber hinaus verfügen sie über eine sehr differenzierte proteolytische Aktivität an ihrer Oberfläche, sodass ein komplexes Wechselspiel zwischen Wirt und Bakterium entsteht (Rasmussen und Björck 2002). Auch *Salmonella* ssp. und *E. coli* können mit Laminin-bindenden Fimbrien menschliches Plasminogen "einfangen" und benutzen dieses, um Basalmembranen und andere Bestandteile der extrazellulären Matrix zu zerstören. In vitro ist so eine signifikante Steigerung der Virulenz zu erreichen (Lähteenmäki et al. 1995, Korhonen et al. 1997, Kukkonen et al. 1998).

Es lag daher nahe zu untersuchen, ob ein solcher Vorgang auch für die Virulenzsteigerung durch Elastase verantwortlich ist. Im positiven Fall wäre dann als zweiter Schritt die Suche nach der verantwortlichen Struktur an der Bakterienoberfläche nötig geworden.

Die zur Klärung dieser Hypothesen durchgeführten Experimente gingen in zwei Richtungen. Zum einen wurde eine Markierung mit spezifischen Anti-Elastase-Antikörpern (Anti-Ela-AK) von eventuell fest gebundener Elastase versucht. In der indirekten Immunfluoreszenz zeigte sich keine Veränderung im Fluoreszenzverhalten zwischen Elastase-behandelten *E. coli* und den unbehandelten Kontrollen. Da aber die Signale nur schwach waren und daher nicht fotografisch dokumentiert werden konnten, wurde zusätzlich mit dem Dotblot eine Anfärbung auf Nitrozellulose mit einer Peroxidase-reaktion unternommen. Auch hier ergab sich keine verstärkte Markierung der behan-

delten Bakterien, sodass eine Bindung von Elastase auf der Bakterienoberfläche nicht nachgewiesen werden konnte und daher unwahrscheinlich ist.

Dieser Befund wurde von einem zweiten Experiment unterstützt. Die proteolytische Aktivität der *E. coli* gegenüber Azocasein änderte sich durch die Vorbehandlung mit Elastase nicht, während in den mitgeführten Standards eine gute Reaktion nachzuweisen war. Der Untersuchungsansatz ist also im Prinzip geeignet, elastolytische Aktivität nachzuweisen, zumal die Azocaseinmoleküle so groß sind, dass sie nicht in die Bakterien internalisiert werden können. Dass die chromophoren Spaltprodukte von den Bakterien internalisiert wurden, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (s. 3.6).

Die Zusammenschau dieser Ergebnisse schließt eine Virulenzsteigerung über eine Bindung der Elastase an die Bakterienoberfläche aus. Ein virulenzsteigernder Mechanismus wie bei Plasminogen liegt bei Elastase also nicht vor. Die Erklärung der Virulenzsteigerung bleibt also weiterhin Gegenstand der Diskussion. Eine Auswertung der in der Literatur für andere Bakterienarten und andere Infektionsmodelle beschriebenen Mechanismen lässt im Wesentlichen zwei Hypothesen zu, nämlich

1. die Steigerung der Expression von Virulenzfaktoren (Hypothese 1, s. 4.4.2) und
2. die posttranslationale Prozessierung/ Modifizierung von Bakterienantigenen oder anderen Virulenzfaktoren durch die Elastase (Hypothese 2, s. 4.4.3).

Diese beiden Hypothesen sollen im Folgenden näher diskutiert werden.

4.4 Mögliche Wirkmechanismen der Virulenzsteigerung

4.4.1 Anatomische und physiologische Überlegungen

Prinzipiell können die *E. coli* an zwei Stellen im Körper mit Elastase in Kontakt kommen: beim Kontakt mit Zellen des Immunsystems, vor allem neutrophilen Granulozyten, und im Darm. Wie in Kap. 1.6 bereits beschrieben, liegt im menschlichen Stuhl eine erhebliche Elastaseaktivität vor (Lembcke 1998). Da die meisten HWI, vor allem die ambulant erworbenen, bei denen *E. coli* der dominierende Erreger ist, ascendierende Infektionen durch temporäre oder dauerhafte Mitglieder der Darmflora sind, muss auch dieser Weg einer Elastasewirkung in der Diskussion berücksichtigt werden. In diesem Modell kommen *E. coli* im Kolon mit der Elastase in Kontakt und erfahren bereits hier die unten näher beschriebenen Veränderungen. Gelangen sie nun

per Verschleppung in die unteren Harnwege, sind die harnwegspathogenen Erreger bereits in einem höher virulenten Stadium und haben so ihre Fähigkeit zur Adhärenz und Internalisierung verbessert. Der Kontakt mit dem Urothel stimuliert dann die Expression weiterer Virulenzfaktoren für die frühe Kolonialisierung der Blase (s. 4.3.2). Dass die Bedingungen im Darm eine Bedeutung für die Expression von Virulenzfaktoren haben und so einen Einfluss auf die Entwicklung eines HWI haben, legen die Ergebnisse von Friman et al. nahe: Isolate aus der Dickdarmflora von Personen mit IgA-Defizienz zeigten einen deutlich geringeren Besatz mit Typ1-Fimbrien als Isolate von IgA-sezernierenden Kontrollpersonen. Wahrscheinlich haben die Bakterienstämme bei Abwesenheit von IgA die Expression von Typ1-Fimbrien reduziert oder ganz eingestellt (Friman et al. 1996).

Die zweite Möglichkeit eines Kontakts zwischen den Bakterien und Elastase besteht in einem Zusammentreffen mit Leukozyten, vor allem in der frühen, zellgestützten Phase der Immunantwort. Leukozyten verfügen über eine große Zahl proteolytischer Enzyme, unter anderem auch Leukozyten-Elastase in hohen Konzentrationen (vgl. 1.6). Auf diese Möglichkeit wird in den folgenden Ausführungen näher eingegangen.

4.4.2 Hypothese 1: Veränderung der Expression von Virulenzfaktoren

Dass widrige Umweltbedingungen für *E. coli* die Expression von verschiedenen Virulenzfaktoren stimulieren können, ist seit langem bekannt. Eine verstärkte Expression von Fimbrien ist z.B. bei hohen Salzkonzentrationen, ungünstigen pH-Bedingungen, Nährstoffmangel und bei subinhibitorischen Konzentrationen von verschiedenen Antibiotika nachzuweisen. Auch Proteine des Stoffwechsels, insbesondere zur Aufnahme des im Urin raren Eisens, von Aminosäuren und Purinbasen werden nach Kontakt mit Urin verstärkt gebildet (s. 1.3.7). Dieses ermöglicht den Bakterien ein besseres Überleben und eine Vermehrung im Urin des Wirts. Schon zu diesem frühen Zeitpunkt der Infektion erfährt das Expressionsmuster offensichtlich eine grundlegende Änderung (Johnson 1991, Neidhardt 1996, Russo et al. 1996, 1999, 2001). Neuere Untersuchungsbefunde deuten darauf hin, dass sich die Expression der Virulenzfaktoren nicht nur in Abhängigkeit von Umgebungsbedingungen, sondern auch im Verlauf einer Infektion ändert. So steigt die Expression von Typ1-Fimbrien im Laufe einer Harnwegsinfektion im Tierexperiment an, während dieselben Stämme in der Kultur nur selten Fimbrien exprimieren. Das entsprechende Steuergen wird dabei auf

„on“ gestellt. Welche Faktoren genau diese Umstellung bedingen, ist noch nicht geklärt (Struve und Krogfeldt 1999). Die stärkste Expression findet sich nach 24 Stunden, also in der frühen Phase der Infektion, und ist offensichtlich eine der wesentlichen Faktoren für die Kolonialisierung der unteren Harnwege. *E. coli*-Stämme, denen durch eine gezielte Mutation die Transkription der Typ1-Fimbrien unmöglich gemacht wurde, waren deutlich weniger virulent in der frühen Infektionsphase (Gunther et al. 2002). Stämme, die Pyelonephritiden auslösen können, stellen die Promotorregion später wahrscheinlich wieder auf „off“, während die Erreger von Zystitiden dieses seltener tun (Gunther et al. 2001). Diese Phasenvariation je nach Umgebung der Bakterien ist auch bei Harnwegsinfektionen durch *Proteus mirabilis* beschrieben worden (Zhao et al. 1997).

Bei Adhäsion von P-Fimbrien-exprimierenden *E. coli* an Wirtszellen kommt es zu einer Steigerung der Expression von Proteinen des Eisenstoffwechsels (Zhang und Normark 1996). Außerdem ändert sich die Zusammensetzung der äußeren Membranproteine (Otto et al. 2001). Über eine veränderte Signalübertragung im Cpx-Signalweg wird auch die Expression von anderen Adhäsinen gesteuert (Otto und Silhavy 2002). Die genauen Regulationsmechanismen sind aber noch unklar. Wahrscheinlich ist aber auch der Kontakt mit einer Oberfläche eine Herausforderung für die Bakterien, auf die sie entsprechend reagieren, oder es stellt das Signal dar, dass die Infektion in eine neue Phase getreten ist, die eine andere Ausstattung mit Virulenzfaktoren erfordert.

Auf Seiten des Wirts finden ebenfalls bereits in der frühen Phase der Infektion, wenige Stunden nach dem Kontakt zwischen Bakterien und Urothel, grundlegende Veränderungen statt. Über den Kontakt mit dem Toll-like-Rezeptor 4 und dem ICAM-1 triggern die Bakterien die Einwanderung von Abwehrzellen, insbesondere von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Agace et al. 1995, Frendéus et al. 2001). Die Adhäsion der Bakterien, und hier vor allem das FimH der Typ1-Fimbrien, induziert gravierende Änderungen im RNA-Expressionsmuster der Urothelzellen. Dieses betrifft neben der großen Gruppe der Zytokine und anderer Entzündungsmediatoren vor allem Faktoren des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und des Gewebeumbaus. Auch Regulatoren der Apoptose werden verstärkt exprimiert (Mysorekar et al. 2002). Es resultiert eine Apoptose der Urothelzellen (Mulvey et al. 1998). Die Produktion von Interleukinen und anderen Zytokinen steigt (Fünfstück et al.

2001). Auch die sehr rasch eingewanderten Zellen des Immunsystems, vor allem neutrophile Granulozyten, erfahren nach Kontakt mit Erregern sehr schnelle und grundlegende Modifikationen des Expressionsmusters. Auch hier erstrecken sich die Änderungen auf viele verschiedene Bereiche, unter anderem Entzündungsmediatoren, Rezeptoren, Apoptose-regulierende Faktoren und Proteine des Zellmembrantransports (Subrahmanyam et al. 2001). Die Veränderungen in menschlichen bzw. anderen eukaryonten Zellen nach Kontakt mit pathogenen Organismen sind wesentlich besser untersucht als die Entwicklung der Expressionsmuster in den Erreger im Verlauf der Infektion. Die Erkenntnisse für Bakterien beschränken sich, wie oben dargestellt, auf einzelne Faktoren.

In der frühen, noch nicht antikörpergestützten Phase der Entzündungsreaktion ist die Freisetzung von proteolytischen Enzymen eine der Säulen der Immunabwehr (s. 1.6.2). Die Anwesenheit von Elastase im entzündeten Kompartiment bedeutet für *E. coli* eine Herausforderung, da dieses Enzym eine sehr wichtige Rolle in der Immunabwehr gramnegativer Bakterien spielt und unter anderem dazu dient, die phagozytierten Bakterien zu lysieren. Auch ein extrazellulärer Angriff auf die Bakterien findet statt (Belaouaj et al. 2000). Es ist also denkbar, dass die Anwesenheit von Elastase die Expression der Virulenzfaktoren fördert. Dass dieses bisher so noch nicht betrachtet worden ist, liegt im Unterschied der experimentellen Ansätze begründet. Bei reinen in vitro-Untersuchungen wurde Elastase bisher noch nicht eingesetzt; dieses wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit unternommen. Bei Tierversuchen, die ein wesentlich realistischeres, aber in allen seinen Einflussfaktoren viel weniger überschaubares Modell der HWI bilden, ist die Elastasewirkung im Rahmen der Infektionsabwehr vorhanden, aber bisher nicht auf molekularer Ebene untersucht worden, zumindest nicht, was die Expression von Virulenzfaktoren angeht. Die ansteigende Elastasekonzentration im Laufe der Entzündung könnte aber ein Faktor für die Änderung der Exprimierung von Virulenzfaktoren sein, wie sie im Tierexperiment beschrieben wurde (s.o.).

Der besseren Übersicht halber wurde in Abb. 4.1 (s. folgende Seite) der Versuch unternommen, bereits bekannte Vorgänge während eines HWI in einem Flussdiagramm darzustellen und die oben ausgeführten Überlegungen zu integrieren.

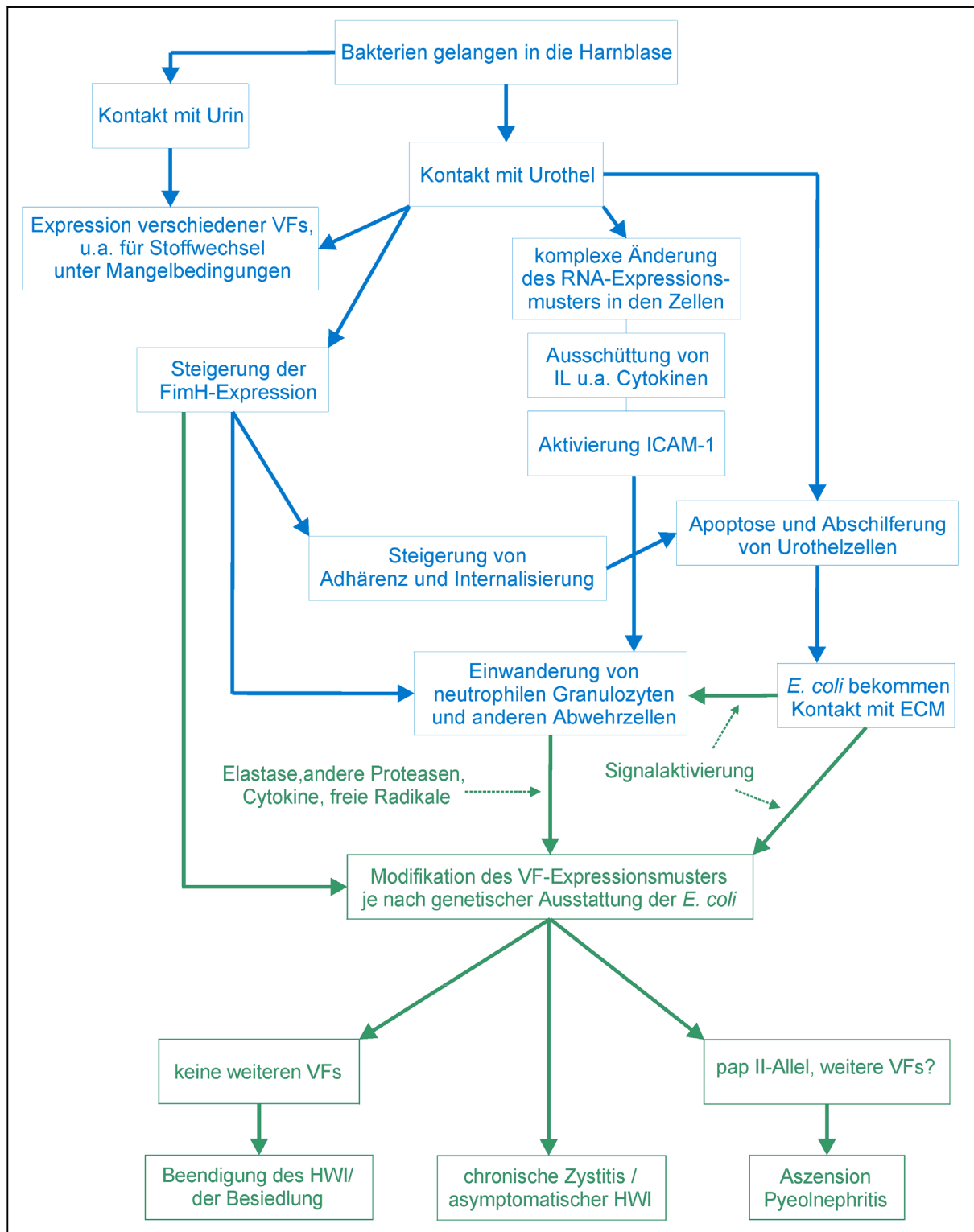


Abb. 4.1: Schematische Darstellung einiger wichtiger Aspekte der Pathogenese von Harnwegsinfektionen. Vorgänge, die auf Angaben aus der Literatur beruhen, sind blau dargestellt. Auf eine Angabe der Quellen wurde der Übersicht halber verzichtet, da sich alle Zitierungen im Text der Diskussion finden (s. 4.4.2). Die in der Diskussion ausgeführten modellhaften Vermutungen sind grün gezeichnet. ECM = extrazelluläre Matrix; ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1; IL = Interleukine; VF(s) = Virulenzfaktor(en)

4.4.3 Hypothese 2: Posttranslationale Modifizierung von Virulenzfaktoren

Eine posttranslationale Modifizierung von Oberflächenantigenen, die zweite Hypothese für die Steigerung der Virulenz, ist bei anderen Bakterienspezies beschrieben. Vor allem bei Erregern von oralen Infektionen werden entsprechende Mechanismen diskutiert. So prozessiert das u.a. bei oralen Infektionen angetroffene Bakterium *Prevotella loeschii* über eine sezernierte Protease Adhäsine und realisiert so eine geringere Verklumpung mit Oralstreptokokken. Dieses wiederum verbessert die Verteilung in dentalen Plaques (Cavedon und London 1993). *Porphyromonas gingivalis* produziert eine extrazelluläre Cystinprotease, die sehr effektiv die Bindung der eigenen Fimbrien an Fibroblasten und andere Zellen sowie an extrazelluläre Matrix steigert. In Abwesenheit der Protease oder bei deren Hemmung nimmt die Adhäsionsfähigkeit deutlich ab (Kontani et al. 1996). Die Autoren nahmen eine Freilegung von Epitopen auf den Matrixproteinen zur Bindung der Bakterien als Erklärung an.

Die Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* hängt wesentlich von der Expression eines bestimmten Oberflächenproteins ab (staphylococcal surface protein, SSP). Dieses liegt in zwei Formen vor, wobei SSP-1 den wesentlichen Beitrag zur Adhäsion an synthetischen Oberflächen leistet. Trypsin des Wirts hydrolysiert dieses SSP-1 zu SSP-2 mit deutlich geringerer Adhäsionswirkung. Außerdem wird die Expression von SSP-1 verringert. Die Autoren diskutierten als eine mögliche Erklärung, dass die Anwesenheit von Trypsin einen widrigen Umweltfaktor darstellt, sodass die Verringerung der Adhäsion und damit eine Steigerung der Verteilung im Körper in dieser Situation für die Erreger günstig ist (Veenstra et al. 1996).

Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass der Kontakt der *E. coli* mit Elastase zu einer proteolytischen Modifizierung eines oder mehrerer Virulenzfaktoren führt. Die posttranslationelle Organisation der Fimbrien sowie der anderen Membranproteine ist ein komplizierter Vorgang und erfordert auch vielfältige proteolytische Aktivitäten, u.a. von sog. Leader-Peptidasen (Neidhardt 1996, Eisenbrandt et al. 2000). Bei der Ausbildung der Pili zur Konjugation zwischen zwei *E. coli* sind ebenfalls Peptidasen beteiligt (Majdalani und Ippen-Ihler 1996). Elastase ist am Ort der Infektion vorhanden, sobald neutrophile Granulozyten eingewandert sind. Die Bakterien könnten also die Elastase nutzen, um die eigenen Oberflächenproteine zu verändern, ihre Zusammensetzung zu modifizieren oder den Aufbau zu beschleunigen. Bei den Adhäsinen

und internalisierungsauslösenden Antigenen handelt es sich um große Moleküle. Proteolytische Modifikationen an der Primärstruktur können also durchaus auch Auswirkungen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur haben. Eine Veränderung der räumlichen Anordnung der Adhäsine ist wahrscheinlich in der Lage, die Reaktion gegenüber Rezeptorproteinen zu verbessern oder zu verschlechtern. Dieser Aspekt einer Proteasenwirkung auf Bakterien ist bisher kaum untersucht worden. Wie bereits unter 4.3.2 ausgeführt wurde, gibt es Hinweise auf eine Wirkung der Elastase auf fimbriale Strukturen, namentlich die Typ1-Fimbrien; insofern ergibt sich hier ein neuer Ansatz zur Untersuchung von Virulenzmechanismen.

Ein weiterer denkbarer Angriffspunkt sind sezernierte Proteine, die durch limitierte Proteolyse nach der Freisetzung verändert und so in eine aktivere Form überführt werden. Bei darmpathogenen *E. coli* ist ein solcher Mechanismus beschrieben: Kokai-Kun et al. zeigten, dass die Zytotoxizität von Shiga-Toxin 2d (einer Variante des Shiga-Toxins von Verotoxin-produzierenden enterohämorrhagischen *E. coli*) gegenüber Vero-Zellen bis zu 1000fach durch die Anwesenheit von Schleim aus dem Dünndarm von Mäusen steigerbar ist. Als zu Grunde liegenden Faktor fanden sie eine Elastase, die die Wirkung des Toxins vervielfacht und eine starke Homologie zur humanen Pankreas-Elastase IIIb aufweist. Vergleiche mit porkiner Pankreas-Elastase zeigten, dass auch diese in der Lage ist, Shiga-Toxin 2d zu aktivieren, wenn auch in einem geringeren Ausmaß (Kokai-Kun et al. 2000). Auch UPEC verfügen über sezernierte Proteine, die teils als Toxine (z.B. CNF-1, α -Hämolysin), teils als adhäsionsfördernde Faktoren wirken. Zumindest einige UPEC-Stämme besitzen ein Typ III-Sekretionssystem (Miyazaki et al. 2002a), das bisher vor allem bei darmpathogenen Erregern bekannt war (Galán und Collmer 1999). Da dieses ein kompliziertes System aus einer Vielzahl von Untereinheiten ist, die nach der Sekretion noch modifiziert und zusammengesetzt werden müssen, ist auch hier ein Angriffspunkt denkbar.

4.5 Ausblick und Skizzierung weiterer experimenteller Ansätze

Die genauen Mechanismen von Pathogenese, Immunantwort und Verlauf von Harnwegsinfektionen bleiben nach wie vor ein Feld der Forschung. Es sind zwar viele Details bekannt, aber es bestehen immer noch Widersprüche und Unklarheiten. Für eine Reihe von lange bekannten Virulenzfaktoren sind in den letzten Jahren neue Wirkmechanismen entdeckt worden, was bei einigen, z.B. den Typ1-Fimbrien, zu

einer grundlegenden Neubewertung ihres Beitrags zum Pathomechanismus geführt hat (s. Kap. 1). Hinzu kommt ein immer detaillierteres Verständnis der zu Grunde liegenden Gene und der Bedeutung der verschiedenen Allele und Mutationen (Johnson et al. 2001, Tseng et al. 2001, 2002). Dennoch bleiben die aus epidemiologischen, klinischen und experimentellen Untersuchungen gewonnenen Daten oft widersprüchlich und lassen vermuten, dass die Virulenzfaktoren nicht vollständig bekannt sind, sondern dass wahrscheinlich noch unentdeckte Mechanismen existieren. Dieses legen u.a. die Ergebnisse von Miyazaki et al. nahe, die Stämme aus Isolaten von klinisch nachgewiesenen HWI fanden, die über keine bisher bekannten fimbriellen Adhäsine und auch nicht über afa I verfügten (Miyazaki et al. 2002b). Die ungezielte Suche nach solchen neuen Virulenzfaktoren mittels PCR und Vergleich der gefundenen Gene mit bekannten Sequenzen anderer Spezies hat zur Entdeckung mehrerer neuer Gene und Genprodukte geführt, deren biologische Funktion, pathogenetische Signifikanz und epidemiologische Bedeutung aber nicht oder nur sehr bruchstückhaft bekannt sind (Russo et al. 1996, 1999, 2001).

Die Erkenntnisse über Virulenzfaktoren haben z.T. schon zu alternativen Therapieansätzen geführt, die sich nicht mehr auf eine alleinige Antibiotikatherapie stützen: Es wurden mehrere Versuche einer Impfung gegen Fimbrien oder deren Bestandteile unternommen; diese haben bei Versuchstieren viel versprechende Ergebnisse erbracht, sind aber für den Menschen zur Zeit noch nicht verfügbar (Langermann und Ballou 2001).

Das Wechselspiel von Bestrebungen des Wirtsorganismus einerseits, den Krankheitserreger zu eliminieren, und des Bakteriums andererseits, sich im Wirt möglichst dauerhaft zu etablieren, ist in einigen Punkten ambivalent:

- Die in großen Mengen freigesetzten proteolytischen Enzyme dienen sehr effektiv der Zerstörung der Bakterien, sind aber auch für die Gewebsdestruktion in den betroffenen Organen verantwortlich (s. 1.6). Diese wiederum erleichtert den Erregern ein Überleben im Gebiet der Entzündung, wenn natürliche Schutzbarrieren wie Epithelien und Basalmembranen nicht mehr existieren und zudem Räume entstehen, in die die Elemente des Immunsystems nicht mehr oder nicht mehr ausreichend eindringen können. Die Zerstörung der Gefäßversorgung trägt dazu bei, und die Verdauung von Bakterien, Zellen des Wirts und extrazellulärer Matrix gibt den Erregern reichlich Nährstoffe.

- Die durch Apoptose der Urothelzellen ausgelöste Abschilferung des Urothels eliminiert zwar einen großen Teil der adhärenenten Bakterien, aber die entstehenden Epitheldefekte mit offen liegender extrazellulärer Matrix ermöglichen übrig gebliebenen Erregern ein leichteres Eindringen in die Tiefe (Mulvey et al. 1998).

Die offensichtlich sehr komplexe Wechselwirkung zwischen Bakterium und Immunsystem des Wirts ist bisher wenig erforscht worden. Infektionsmodelle berücksichtigen selten die Dynamik, die einer Infektion von der Etablierung des Erregers bis zur Elimination oder Chronifizierung innewohnt. Über die Vorgänge auf Seiten des Wirts sind in jüngerer Zeit viele Erkenntnisse gewonnen worden (s.o.). Über die Erreger existieren bisher deutlich weniger Informationen. Die Arbeiten, die sich mit dieser Frage beschäftigen, legen eine große Bedeutung der Änderung von Expressionsmustern nahe (Zhang und Normark 1996, Mulvey et al. 1998, Gunther et al. 2001, 2002).

Die Ergebnisse dieser Dissertation werfen neue Fragen auf, deren Richtungen unter 4.4 bereits diskutiert worden sind. Zur genauen Klärung, welche Virulenzfaktoren an der Adhärenz- und Internalisierungssteigerung beteiligt sind, erscheinen verschiedene weiterführende Versuchsansätze denkbar. So könnten gezielt Mutanten hergestellt werden, die den jeweiligen Faktor nicht mehr exprimieren. Dieses ist aber sehr aufwändig, da die Anzahl der möglichen Gene sehr groß ist und bereits die Fimbrien aus einer Vielzahl von Untereinheiten bestehen. Eine Fokussierung auf die Fimbrien würde auch alle weiteren Virulenzfaktoren außer Acht lassen. Besser als eine erste Screenigmethode geeignet wäre die quantitative bzw. semiquantitative Durchführung einer Multiplex-PCR, wie sie für die Detektion von Virulenzfaktoren sowohl bei uropathogenen als auch darmpathogenen *E. coli* bereits beschrieben wurde (China et al. 1999, Pass et al. 2000). Auffälligkeiten in dieser Untersuchung könnten dann durch genauere PCR-Verfahren, Subtraktionshybridisierungen und/oder gezielte Mutationen genauer untersucht werden.

Aufschluss über die oben diskutierte Möglichkeit einer posttranslationellen Modifikation der Virulenzfaktoren würde die Isolierung der Faktoren von behandelten und unbehandelten *E. coli* und die nachfolgende Immobilisierung an Latexpartikel geben. Dieses Verfahren zur isolierten Untersuchung einzelner Adhäsine ist gut etabliert und von vielen Autoren bereits beschrieben. Außerdem könnten die isolierten Antigene

einer gezielten Proteolyse unterworfen und dann elektrophoretisch aufgetrennt werden. Im Western-Blot wäre dann eine genaue Bestimmung der Proteinfragmente möglich; dieses würde eine spezifische Bestimmung eventuell veränderter oder entfernter Domänen erlauben.

5 Schlussfolgerungen

Harnwegsinfektionen sind nach wie vor ein großes, weltweites Problem der Medizin. Dieses betrifft alle Bereiche des Gesundheitssystems und ist besonders in Fachgebieten und Abteilungen, in denen immunsupprimierte Patienten behandelt werden, von immer größer werdender Bedeutung. Die rapide Zunahme von Antibiotikaresistenzen gerade bei Erregern von nosokomialen Harnwegsinfektionen macht die Entwicklung von therapeutischen Ansätzen notwendig, die die Infektion an anderer Stelle als eine antibiotische Therapie beeinflussen. Dafür sind genaue Kenntnisse über die Pathogenese der Infektionen erforderlich.

Die Forschungsergebnisse der vergangenen Jahrzehnte haben gezeigt, dass HWI durch ein außerordentlich komplexes Zusammenspiel von Erreger und Wirt charakterisiert sind, das in seinen Einzelheiten nur unzureichend verstanden ist. Über die Wirkung des Immunsystems auf die Virulenz von *E. coli* liegen nur wenige Erkenntnisse vor. Daher wurde in der vorliegenden Dissertation der Versuch unternommen, die Wirkung eines Teilbereichs der unspezifischen Abwehr, nämlich eines proteolytischen Enzyms, der Elastase, auf den Verlauf einer Infektion in einem einfachen Infektionsmodell zu untersuchen.

Die vorgelegte Dissertation beschreibt erstmals eine Steigerung der Adhärenz und Internalisierung von uropathogenen *E. coli* in einem Modell der Harnwegsinfektion durch die Anwesenheit einer Protease. Adhärenz und Internalisierung sind durch viele Untersuchungen übereinstimmend als wesentliches pathogenetisches Prinzip bei der Entwicklung von HWI bestätigt worden. Daher wird die beschriebene Steigerung per definitionem als Erhöhung der Virulenz der *E. coli* interpretiert, und den bekannten, sehr vielgestaltigen Wirkungen der proteolytischen Enzyme wird eine weitere Facette hinzugefügt.

Der Mechanismus der Virulenzsteigerung durch Elastase lässt sich durch die präsentierten Ergebnisse allerdings nicht erklären. Eine Hypothese, nämlich die Bindung der Elastase an die Bakterienoberfläche, konnte ausgeschlossen werden. Weitere Hypothesen wurden vor dem Hintergrund der Literatur formuliert und Vorschläge zu ihrer experimentellen Überprüfung unterbreitet: Zum einen eine Änderung der Expression von Virulenzfaktoren, zum anderen eine posttranslationale Modifikation von Oberflä-

chenantigenen oder sezernierten Proteinen. Eine schlüssige Beantwortung der aufgeworfenen Fragen steht gleichwohl aus und erfordert weitergehende Untersuchungen. Deren mögliche Richtung wurde skizziert. Die genaue Bedeutung der beobachteten Wirkung für die Entstehung von Infektionen ist gleichfalls offen, da bisher keine publizierten Erkenntnisse hinsichtlich einer Elastasewirkung bei HWI im Tierexperiment und keine epidemiologischen Untersuchungen zu diesem Thema existieren. Die Ergebnisse werfen eine Reihe neuer Fragen auf, deren Beantwortung sehr hilfreich für das Verständnis der immer noch nicht zufriedenstellend verstandenen Infektionen der Harnwege sowie anderer Organe und Organsysteme des Menschen sein wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Agace WW, Patarroyo M, Svensson M, Carlemalm E and Svanborg C (1995): *Escherichia coli* induces transuroepithelial neutrophil migration by an intercellular adhesion molecule-1-dependent mechanism. *Infect Immun* 63(10):4054-4062
2. Bakakos P, Messaritaki A, Mandyla H, Nicolaidou P and Anagnostakis D (2002): Plasma and urine elastase alpha-1-proteinase inhibitor levels in neonatal urinary tract infection. *Biol Neonate* 81(2):109-12
3. Baltimore RS, Huie SM, Meek JI, Schuchat A and O'Brien KL (2001): Early-onset neonatal sepsis in the era of group B streptococcal prevention. *Pediatrics* 108: 1094-98
4. Belaaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN and Shapiro SD (1998): Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature Medicine* 4: 615-618
5. Belaaouaj A, Kim KS and Shapiro SD (2000): Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 289:1185-8
6. Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS and Hammerschmidt S (2001): α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40 (6): 1273-1287
7. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN and Bourne PE (2000): The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242
8. Beutin L (1991): The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* 180: 167-182
9. Bhakdi S, Mackman N, Nicaud JM and Holland IB (1986): *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun* 52: 63-9
10. Bhakdi S, Greulich S, Muhly M, Eberspacher B, Becker H, Thiele A and Hugo F (1989): Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med* 169: 737-54
11. Bhakdi S, Muhly M, Korom S and Schmidt G (1990): Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human leukocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *J Clin Invest* 85: 1746-53

12. Bliska JB, Galán JE and Falkow S (1993): Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 73: 903-920
13. Bonadio M, Meini M, Spitaleri P and Gigli C (2001): Current microbiological and clinical aspects of urinary tract infections. *Eur Urol* 40(4):439-44
14. Britigan BE, Railsback MA and Cox CD (1999): The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immun* 67: 1207-1212
15. Callegari C, Laborde NP, Buenaflor G, Nascimento CG, Brasel JA and Fisher DA (1988): The source of urinary epidermal growth factor in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 58: 26-31
16. Carney DE, McCann UG, Schiller HJ, Gatto LA, Steinberg J, Picone AL and Nieman GF (2001): Metalloproteinase inhibition prevents acute respiratory distress syndrome. *J Surg Res* 99(2):245-52
17. Cascón A, Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Hernanz C, Luengo JM and Naharro G (2000): A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 68(6): 3233-41
18. Cavedon K and London J (1993): Adhesin degradation: a possible function for a *Prevotella loescheii* protease? *Oral Microbiol Immunol* 8(5): 283-287
19. China B, Goffaux F, Pirson V and Mainil J (1999): Comparison of eae, tir, espA and espB genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 178:177-182
20. Classen M, Diehl V und Kochsiek K (Hrsg.): Innere Medizin. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1998
21. Connell H, Agace W, Klemm P, Schembri M, Marild S and Svanborg C (1996): Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9827-9832
22. Cregge RJ, Durham SL, Farr RA, Gallion SL, Hare CM, Hoffman RV, Janusz MJ, Kim HO, Koehl JR, Mehdi S, Metz WA, Peet NP, Pelton JT, Schreuder HA, Sunder S and Tardif C (1998): Inhibition of human neutrophil elastase. 4. Design, synthesis, X-ray crystallographic analysis, and structure-activity relationships for a series of P2-modified, orally active peptidyl pentafluoroethyl ketones. *J Med Chem* 41: 2461

23. Darouiche RO, Smith JA Jr, Hanna H, Dhabuwala CB, Steiner MS, Babaian RJ, Boone TB, Scardino PT, Thornby JI and Raad II (1999): Efficacy of antimicrobial-impregnated bladder catheters in reducing catheter-associated bacteriuria: a prospective, randomized, multicenter clinical trial. *Urology* 54(6):976-81
24. Eisenbrandt R, Kalkum M, Lurz R and Lanka E (2000): Maturation of IncP pilin precursors resembles the catalytic Dyad-like mechanism of leader peptidases. *J Bacteriol* 182(23): 6751-61
25. Finlay BB and Cossart P (1997): Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276: 718-25
26. Frendéus B, Wachtler C, Hedlund M, Fischer H, Samuelsson P, Svensson M and Svanborg C (2001): *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol Microbiol* 40(1): 37-51
27. Fretzayas A, Moustaki M, Gourgiotis D, Bossios A, Koukoutsakis P and Stavrinadis C (2000): Polymorphnuclear elastase as a diagnostic marker of acute pyelonephritis in children. *Pediatrics* 105: E28
28. Friman V, Adlerberth I, Connell H, Svanborg C, Hanson LA and Wold AE (1996): Decreased expression of mannose-specific adhesins by *Escherichia coli* in the colonic microflora of immunoglobulin A-deficient individuals. *Infect Immun* 64(7):2794–2798
29. Fünfstück R, Franke S, Hellberg M, Ott U, Knöfel B, Straube E, Sommer M and Hacker J (2001): Secretion of cytokines by uroepithelial cells stimulated by *Escherichia coli* and *Citrobacter* ssp.. *Int J Antimicrob Agents* 17: 253-258
30. Galán JE and Collmer A (1999): Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284:1322-1328
31. Galán JE, Pace J and Hayman MJ (1992): Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella typhimurium*. *Nature* 357: 588-589
32. Grude N, Tveten Y and Kristiansen BE (2001): Urinary tract infections in Norway: bacterial etiology and susceptibility. A retrospective study of clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 7(10):543-7
33. Gunther NW, Lockatell V, Johnson DE and Mobley HLT (2001): In vivo dynamics of Type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. *Infect Immun* 69(5): 2838–2846

34. Gunther NW, Snyder JA, Lockatell V, Blomfield I, Johnson DE and Mobley HLT (2002): Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* Type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked on or off. *Infect Immun* 70(7):3344-3354
35. Hacker J and Kaper JB (2000): Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54: 641-79
36. Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE und Ullmann U (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1999
37. Holt DE, Halket S, de Louvois J and Harvey D (2001): Neonatal meningitis in England and Wales: 10 years on. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 84: F85-89
38. Hooton TM, Scholes D, Hughes JP, Winter C, Roberts PL, Stapleton AE, Stergachis A and Stamm WE (1996): A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *N Engl J Med* 335:468-474
39. Hooton TM, Scholes D, Stapleton AE, Roberts PL, Winter C, Gupta K, Samadpour M and Stamm WE (2000): A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active young women. *N Engl J Med* 343:992-997
40. Iadarola P, Lungarella G, Martorana PA, Viglio S, Guglielminetti M, Korzus E, Gorrini M, Cavarra E, Rossi A, Travis J and Luisetti M (1998): Lung injury and degradation of extracellular matrix components by *Aspergillus fumigatus* serine proteinase. *Exp Lung Res* 24: 233-35
41. Ishikawa N, Kamitsuji H, Murakami T, Nakayama A and Umeki Y (2000): Plasma levels of granulocyte elastase-alpha1-proteinase inhibitor complex in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Pediatr Int* 42(6):637-41
42. Johnson JR (1991): Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 4 (1): 80-128
43. Johnson JR, O'Bryan TT, Delavari P, Kuskowski M, Stapleton A, Carlino U and Russo TA (2001): Clonal relationships and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis. *J Infect Dis* 183(10):1508-17
44. Jouve M, Garcia MI, Courcoux P, Labigne A, Gounon P and Le Bougu  nec C (1997): Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *E.coli* carrying the afa- 3 gene cluster are mediated by the afaE and afaD proteins, respectively.

- Infect Immun 65: 4082-4089
45. Kahlmeter G (2000): The ECO.SENS Project: a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens--interim report. J Antimicrob Chemother Sep;46 Suppl 1:15-22
 46. Kaneko K, Kudoh I, Hattori S, Yamada H, Ohara M, Wiener-Kronish J and Okumura F (1997): Neutrophil elastase inhibitor, ONO-5046, modulates acid-induced lung and systemic injury in rabbits. Anesthesiology 87: 635-41
 47. Kanno N, Nonomura N, Miki T, Kojima Y, Takahara S, Nozaki M and Okuyama A (1998): Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of the bladder cancer cell line. J Urol 159(2): 586-590
 48. Khan AS, Knier B, Oelschlaeger TA, van Die I, Korhonen T and Hacker J (2000): Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 68: 3541-3547
 49. Kokai-Kun JF, Melton-Celsa AR and O'Brien AD (2000): Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. J Biol Chem 275(5): 3713-21
 50. Kon Y, Tsukuda H, Hasegawa T, Igarashi K, Wada K, Suzuki E, Arakawa M and Gejyo F (1999): The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. FEMS Immunol Med Microbiol 25: 313-21
 51. Kontani M, Ono H, Shibata H, Okamura Y, Tanaka T, Fujiwara T, Kimura S and Hamada S (1996): Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins.. Infect Immun 64(3): 756-62
 52. Korhonen TK, Lähteenmäki K, Kukkonen M, Pouttu R, Hynönen U, Savolainen K, Westerlund-Wikström B and Virkola R (1997): Plasminogen receptors: turning *Salmonella* and *Escherichia coli* into proteolytic organisms. Adv Exp Biol Med 412: 185-92
 53. Kukkonen M, Saarela S, Lähteenmäki K, Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Rhen M and Korhonen TK (1998): Identification of two Laminin-binding fimbriae, the Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and the G fimbria of *Escherichia coli*, as plasminogen receptors. Infect Immun 66 (10): 4965-4970

54. Lähteenmäki K, Virkola R, Pouutu R, Kuusela P, Kukkonen M and Korhonen TK (1995): Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun* 63 (9): 3659-3664
55. Langermann S and Ballou WR Jr. (2001): Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *Escherichia coli* urinary tract infections. *J Infect Dis* 183(Suppl 1):S84–6
56. Langner J, Wakil A, Zimmermann M, Ansorge S, Bohley P, Kirschke H und Wiederanders B (1973): Aktivittsbestimmung proteolytischer Enzyme mit Azokasein als Substrat. *Acta Biol Med Germ* 31:1-18
57. Lecker A, Kreft B, Sandmann J, Bates J, Wasenauer G, Muller H, Sack K and Kumar S (1997): Tamm-Horsfall protein inhibits binding of S- and P-fimbriated *Escherichia coli* to human renal tubular epithelial cells. *Exp Nephrol* 5(1): 38-46
58. Lembcke B in: Thomas L (Hrsg.): Labor und Diagnose, 5. Auflage. TH-Books, Frankfurt a.M. 1998
59. Luisetti M, Sturani C, Sella D, Madonini E, Galavotti V, Bruno G, Peona V, Kucich U, Dagnino G, Rosenbloom J, Starcher B and Grassi C (1996): MR899, a neutrophil elastase inhibitor, in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur Respir J* 9: 1482-1486
60. Majdalani N and Ippen-Ihler K (1996): Membrane insertion of the F-pilin subunit is Sec independent but requires leader peptidase B and the proton motive force. *J Bacteriol* 178(13): 3742-47
61. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS and Hultgren SJ (2000): Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 19(12): 2803-2812
62. Martinez JJ and Hultgren SJ (2002): Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 4(1): 19-28
63. Menestrina G, Mackman N, Holland IB and Bhakdi S (1987): *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 905: 109-17
64. Messing EM, Hanson P, Ulrich P and Erturk E (1987): Epidermal growth factor--interactions with normal and malignant urothelium: in vivo and in situ studies. *J Urol* 138(5): 1329-35

65. Messing EM, and Reznikoff CA (1987): Normal and malignant human urothelium: in vitro effects of epidermal growth factor. *Cancer Res* 47(9): 2230-2235
66. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Akaza H and Hayashi H (2002a): Identification of type III secretion system in uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 212:221-28
67. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata Yasuoka M, Akaza H and Hayshi H (2002b): Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 33(1):23-6
68. Momohara S, Kashiwazaki S, Inoue K, Saito S and Nakagawa T (1997): Elastase from polymorphnuclear leukocyte in articular cartilage and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 16: 133-40
69. Moore AR, Appelboam A, Kawabata K, Da Silva JA, D'Cruz D, Gowland G and Willoughby DA (1999): Destruction of articular cartilage by alpha2 macroglobulin elastase complexes: role in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58: 109-13
70. Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J and Hultgren SJ (1998): Induction and evasion of host defenses by type1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282: 1494-1497
71. Mysorekar IU, Mulvey MA, Hultgren SJ and Gordon JI (2002): Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277(9): 7412–7419
72. Neidhardt FC (Hrsg.): *Escherichia coli* and *Salmonella* - cellular and molecular biology. American Society for Microbiology Press, Washington DC 1996
73. Nowicki B, Selvarangan R and Nowicki S (2001): Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis* 183(Suppl 1):S24-7
74. Oda T, Hotta O, Taguma Y, Kitamura H, Sudo K, Horigome I, Chiba S, Yoshizawa N and Nagura H (1997): Involvement of neutrophil elastase in crescentic glomerulonephritis. *Hum Pathol* 28: 720-728
75. Oelschlaeger TA, Barrett TJ and Kopecko DJ (1994): Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Infect Immun* 62(11): 5142-5150

76. Oelschlaeger TA, Dobrindt U and Hacker J (2002): Virulence factors of uropathogens. *Curr Opin Urol* 12: 33-38
77. Orskov I and Orskov F (1990): Serologic classification of fimbriae. *Curr Top Microbiol Immunol* 151:71-90
78. Otto K, Norbeck J, Larsson T, Karlsson KA and Hermannsson M (2001): Adhesion of Type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of Outer Membrane Proteins. *J Bacteriol* 183(8): 2445-2453
79. Otto K and Silhavy TJ (2002): Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4): 2287-2292
80. Pace J, Hayman MJ and Galán JE (1993): Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. *Cell* 72: 505-514
81. Pak J, Pu Y, Zhang ZT, Hasty DL and Wu XR (2001): Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to Uroplakin Ia and Ib receptors. *J Biol Chem* 276(13): 9924-9930
82. Pass MA, Odedra R and Batt RM (2000): Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol* 38(5):2001-04
83. Patrick S and Larkin MJ: Immunological and molecular aspects of bacterial virulence. John Wiley & Sons Ltd, Chichester/UK 1995
84. Pere A, Leinonen M, Vaisanen-Rhen V, Rhen M and Korhonen TK (1985): Occurrence of type-1C fimbriae on *Escherichia coli* strains isolated from human extraintestinal infections. *J Gen Microbiol* 131(7):1705-11
85. Powers JC, Gupton BF, Harley AD, Nishino N and Whitley RJ (1977): Specificity of porcine pancreatic elastase, human leukocyte elastase and cathepsin G. *Biochim Biophys Acta* 485: 156-166
86. Prasadarao NV, Wass CA, Hacker J, Jann K and Kim KS (1993): Adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to brain glycolipids mediated by *sfaA* gene-encoded protein of S-fimbriae. *J Biol Chem* 268(14): 10356-10363
87. Rasmussen M and Björck L (2002): Proteolysis and its regulation at the surface of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 43(3): 537–544

88. Raz R, Schiller D and Nicolle LE (2000): Chronic indwelling catheter replacement before antimicrobial therapy for symptomatic urinary tract infection. *J Urol* Oct;164(4):1254-8
89. Russo TA, Jodush ST, Brown JJ and Johnson JR (1996): Identification of two previously unrecognized genes (*guaA* and *argC*) important for uropathogenesis. *Mol Microbiol* 22: 217-29
90. Russo TA, Carlino UB, Mong A and Jodush ST (1999): Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infect Immun* 67(10):5306-14
91. Russo TA, Carlino UB and Johnson JR (2001): Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 69(10):6209-16
92. Saint S and Lipsky BA (1999): Preventing catheter-related bacteriuria: should we? Can we? How? *Arch Intern Med* 159(8):800-8
93. Schembri MA and Klemm P (2001): Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel FimH variants and ramifications for virulence. *Infect Immun* 69(3): 1322–1328
94. Schilling JD, Mulvey MA and Hultgren SJ (2001): Dynamic interactions between host and pathogen during acute urinary tract infections. *Urology* 57 (6 Suppl 1): 56-61
95. Schmidt KH, Mann K, Cooney J and Köhler W (1993): Multiple binding of type 3 streptococcal M protein to human fibrinogen, albumin and fibronectin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 7(2). 135-143
96. Schmidt T: In-vitro-Untersuchungen zum Einfluss von Acimethin auf die bakterielle Zytoadhaerenz uropathogener *Escherichia coli*. Dissertation Jena 1997
97. Schneider T und Schubert S: Untersuchungen zur Signaltransduktion bei der Adhärenz und Internalisation von harnwegspathogenen *Escherichia coli*-Stämmen an humanen Epithelzellen. Dissertation Jena 1999
98. Schomburg D und Salzmänn M (Hrsg.): *Enzyme Handbook*, Band 5. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1991
99. Sepper R, Kontinen YT, Ingman T and Sorsa T (1995): Presence, activities, and molecular forms of cathepsin G, elastase, alpha 1- antitrypsin, and alpha 1- antichymotrypsin in bronchiectasis. *J Clin Immunol* 15: 27-34

100. Shi J and Ganz T (1998): The role of protegrins and other elastase- activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect Immun* 66(8): 3611-17
101. Shimizu T, Takahashi Y, Takeuchi K, Majima Y and Sakakura Y (2000): Role of neutrophil elastase in endotoxin-induced mucus hypersecretion in rat nasal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109(11):1049-54
102. Shin JS, Gao Z and Abraham SN (2000): Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* 289: 785-788
103. Shin JS and Abraham SN (2001): Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens. *Immunology* 102: 2-7
104. Sokol PA, Kooi C, Hodges RS, Cachia P and Woods DE (2000): Immunization with a *Pseudomonas aeruginosa* elastase peptide reduces severity of experimental lung infections due to *P. aeruginosa* or *Burkholderia cepacia*. *J Infect Dis* 181(5): 1682-92
105. Spierer A and Kessler E (1984): The effect of 2-mercaptoacetyl-L-phenylalanyl-L-leucine, a specific inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, on experimental *Pseudomonas* keratitis in rabbit eyes. *Curr Eye Res* 3: 645-50
106. Starkey PM and Barrett AJ (1976): Human lysosomal elastase. Catalytic and immunological properties. *Biochem J* 155(2):265-71
107. Starkey PM, Barrett AJ and Burleigh MC (1977): The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. *Biochim Biophys Acta* 483: 386-97
108. Stommer P (1982): Investigations into various pancreatic enzymes. *Exp Pathol* 22(4):203-209
109. Straube E, Knöfel B, Schneider T, Schubert S and Wetzker R (2000): Internalization of extraintestinal *E.coli* O18 strains by epithelial cells is modulated by EGF, insulin, and effectors of transmembrane signal transduction. *Int J Med Microbiol* 290: 65-73
110. Straube E, Kretschmar M, Schmidt G, Marre R, Kreft B and Zingler G (1992): Is *E. coli* invading tubuloepithelial cells?. *Zbl Bakteriologie* 277: 193-203
111. Straube E, Schmidt G, Marre R and Hacker J (1993): Adhesion and invasion of *E. coli* strains expressing various pathogenicity determinants. *Zbl Bakteriologie* 278: 218-228

112. Struve C and Krogfelt KA (1999): In vivo detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiology* 145: 2683–2690
113. Subrahmanyam YVBK, Yamaga S, Prashar Y, Lee HH, Hoe NP, Kluger Y, Gerstein M, Goguen JD, Newburger PE and Weissman SM (2001): RNA expression patterns change dramatically in human neutrophils exposed to bacteria. *Blood* 97(8):2457-2468
114. Sukumaran SK, Quon MJ and Prasadaraao NV (2002): *Escherichia coli* K1 internalization via caveolae requires caveolin-1 and protein kinase Calpha interaction in human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277(52): 50716-724
115. Taggart C, Coakley RJ, Greally P, Canny G, O'Neill SJ and McElvaney NG (2000): Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by TNFa and IL8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(1): L33-41
116. Tambyah PA, Halvorson KT and Maki DG (1999): A prospective study on pathogenesis of catheter-associated urinary tract infections. *Mayo Clin Proc* 74: 131-136
117. Tseng CC, Huang JJ, Ko WC, Yan JJ and Wu JJ (2001): Decreased predominance of papG class II allele in *Escherichia coli* strains isolated from adults with acute pyelonephritis and urinary tract abnormalities. *J Urol* 166: 1643-1646
118. Tseng CC, Wu JJ, Liu HL, Sung JM, Huang JJ (2002): Roles of host and bacterial virulence factors in the development of upper urinary tract infection caused by *Escherichia coli*. *Am J Kidney Dis* 39(4):744-52
119. Twining SS, Davis SD and Hyndiuk RA (1986): Relationship between proteases and descemetocoele formation in experimental *Pseudomonas* keratitis. *Curr Eye Res* 5:503-10
120. Veenstra GJ, Cremers FF, van Dijk H and Fleer A (1996): Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 178(2): 537-41
121. Vincent SH, Painter SK, Luffer-Atlas D, Karanam BV, McGowan E, Cioffe C, Doss G and Chiu SH (1996): Orally active inhibitors of human leukocyte elastase.I.Disposition of L-683, 845 in rats and rhesus monkeys. *Drug Metab Dispos* 24: 1369-1377
122. Virkola R, Westerlund B, Holthofer H, Parkkinen J, Kekomaki M, Korhonen TK (1988): Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder. *Infect Immun* 56(10):2615-22

123. Warren JW (1997): Catheter-associated urinary tract infections.
Infect Dis Clin North Am 11(3):609-22
124. Wiederanders B, Kirschke H and Schaper S (1986): The azocasein-urea-pepstatin
assay discriminates between lysosomal proteinases.
Biomed Biochim Acta 45: 11-12, 1477-83
125. Zhang JP and Normark S (1996): Induction of gene expression in *Escherichia coli* after
pilus-mediated adherence. Science 273: 1234-36
126. Zhao H, Li X, Johnson DE, Blomfield I and Mobley HL (1997): In vivo phase variation of
MR/P fimbrial gene expression in *Proteus mirabilis* infecting the urinary tract.
Mol Microbiol 23(5): 1009-19

7 Anhang

7.1 Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. Straube, Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena, danke ich für die Überlassung des Themas und für die gute und engagierte Betreuung.

Frau Dr. B. Knöfel und Herrn Dr. K.-H. Schmidt, Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena, danke ich für stete Hilfestellung und viele hilfreiche Diskussionen zur Durchführung der Versuche, insbesondere zur Antikörperisolierung, Fluoreszenzmarkierung und zum Dotblot-Verfahren, sowie für das Überlassen der Antikörper und Reagenzien.

Herrn Prof. Dr. B. Wiederanders, Institut für Biochemie der FSU Jena, verdanke ich wertvolle Hinweise zur Messung der proteolytischen Aktivität.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau E. Ilse bedanken, die mich in die Zellkulturtechniken und die Adhärenz- und Internalisierungsversuche eingeführt hat und ohne deren hervorragende technische Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht hätte entstehen können.

Den Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Herrn F. Rost, danke ich für die Versorgung mit Agarplatten, Puffern und sterilen Materialien.

Dem *Förderverein des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena e.V.* danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums, das mir ein Semester intensive Laborarbeit ermöglicht hat.

Meiner Cousine Stefanie Gräfin v. Pfeil danke ich für ihr kritisches und konstruktives Korrekturlesen des Manuskripts.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht und mich stets liebevoll unterstützt haben.

Zum Schluß danke ich ganz besonders meiner Frau Christiane, die mir immer mit Aufmunterung, Teilnahme, Ansporn und viel Liebe zur Seite gestanden hat.

7.2 Lebenslauf

Name	v. Wulffen, Werner
Geburtsdatum	4. Januar 1975
Geburtsort	Hannover
Familienstand	verheiratet seit dem 6. Oktober 2000 mit Christiane v. Wulffen geb. v. der Hardt
8/1981 - 7/1985	Besuch der Grundschule Isernhagen
8/1985 – 7/1987	Besuch der Orientierungsstufe Großburgwedel
8/1987 – 6/1994	Besuch des Gymnasiums Großburgwedel
6/1994	Abitur
7/1994 – 9/1995	Zivildienst
10/1995 – 7/2002	Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
4/2002	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Erhalt der Teilapprobation
9/2002 – 2/2003	Arzt im Praktikum am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
seit 4/2003	Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik II, Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen
Gießen, d. 12.07.2003	Werner v. Wulffen

7.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Herr Prof. Dr. E. Straube, Institut für Medizinische Mikrobiologie, FSU Jena
- Frau Dr. B. Knöfel, vormals Institut für Medizinische Mikrobiologie, FSU Jena
- Herr Dr. R. Vollandt, Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation, FSU Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.